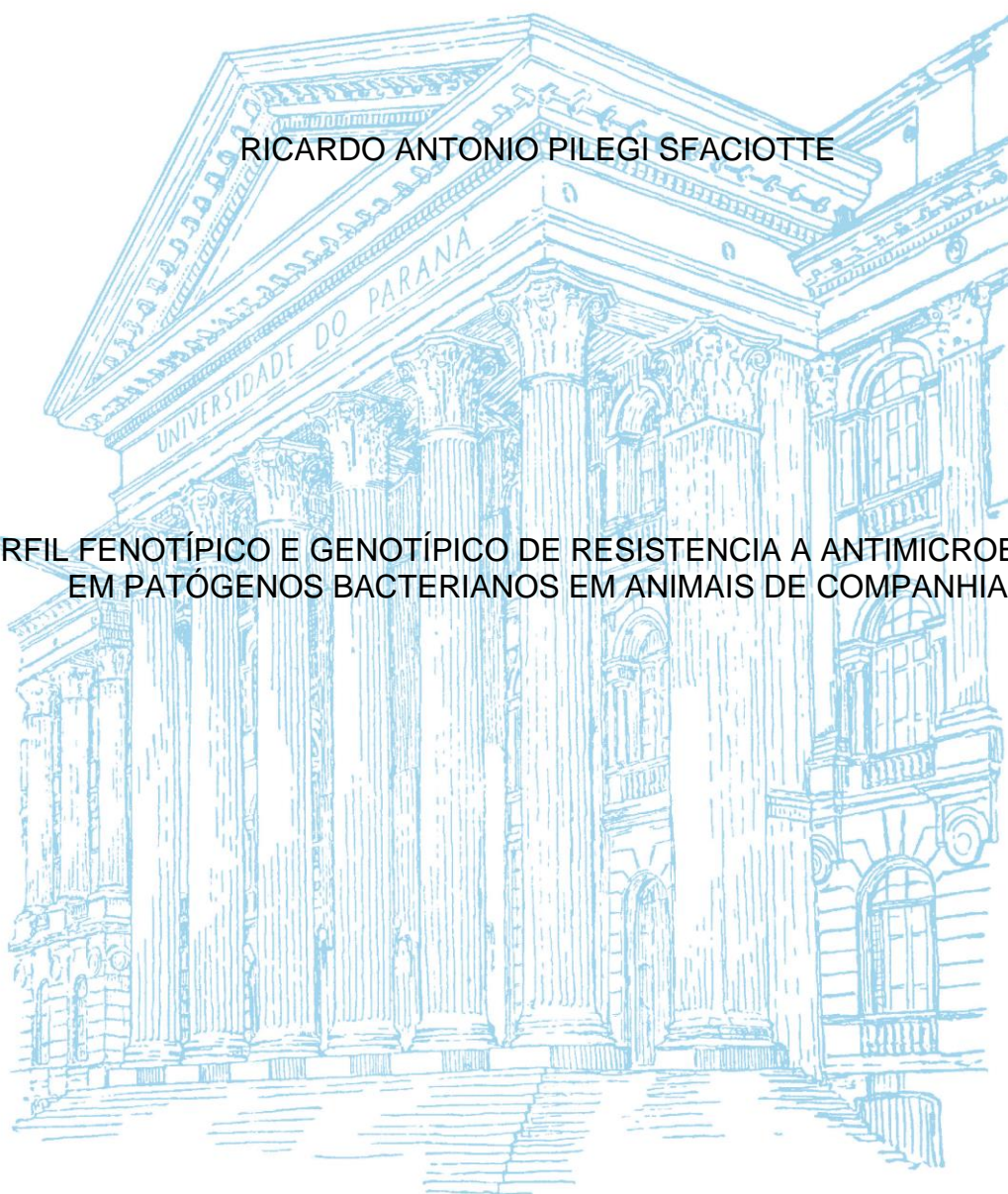


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RICARDO ANTONIO PILEGI SFACIOTTE

PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS  
EM PATÓGENOS BACTERIANOS EM ANIMAIS DE COMPANHIA



PALOTINA

2014

RICARDO ANTONIO PILEGI SFACIOTTE

PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS  
EM PATÓGENOS BACTERIANOS EM ANIMAIS DE COMPANHIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Cristina Osaki  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheila Rezler  
Wosiacki

PALOTINA

2014

## Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S523      Sfaciotte, Ricardo Antonio Pilegi  
         Perfil fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos em  
         Patógenos bacterianos em animais de companhia / Ricardo Antonio  
         Pilegi Sfaciotte ; Orientadora, Silvia Cristina Osaki ; Coorientadora,  
         Sheila Rezler Wosiacki - Palotina, PR, 2014.  
         119p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, PR – Programa de Pós-Graduação em Ciência  
Animal, 2014.

Inclui referências

1. Ciência Animal. 2. Micro-organismos. 3. Resistência antimicrobiana.  
I. Silvia Cristina Osaki. II. Sheila Rezler Wosiacki . III. Universidade  
Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência  
Animal. IV. Título.

CDU 579.62

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL




## TERMO DE APROVAÇÃO

RICARDO ANTONIO PILEGI SFACIOTTE,

"PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS  
EM PATÓGENOS BACTERIANOS DE ANIMAIS DE COMPANHIA".

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no  
Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração Saúde Animal,  
Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Sílvia Cristina Osaki

Presidente/Coorientador: Universidade Federal do Paraná

  
Dra. Edna Tereza de Lima

Membro: Universidade Federal do Paraná

  
Prof. Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros

Membro: Universidade Federal do Paraná

Palotina, 02 de setembro de 2014

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ricardo Antonio Pilegi Sfaciote, filho de Carlos Alberto Sfaciote e Aparecida de Fátima Pilegi. Natural de Maringá-PR 26/10/1988. Médico Veterinário formado no ano de 2012 pela Universidade Estadual de Maringá - *Campus* Umuarama. Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina na área de Microbiologia aplicada à Produção Animal. Bolsista de Iniciação científica nos anos de 2010 e 2011, atuando na área de microbiologia veterinária, infecção hospitalar e resistência antimicrobiana.

*“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”*

*Roberto Shinyashiki*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por todas as oportunidades e por ter iluminado o meu caminho até essa etapa muito importante da minha vida.

Aos meus pais, Carlos Sfaciotte e Cidinha Pilegi, por todos os ensinamentos, conselhos e por terem me apoiado em todas as minhas decisões, sempre me mostrando os melhores caminhos a seguir, mesmo alguns deles sendo difíceis e tortuosos. Graças a esses preceitos que me tornei a pessoa que sou hoje e pretendo ser até o fim da minha vida.

À minha irmã, Francielli Sfaciotte, que sempre foi minha mais leal amiga em todos os momentos de minha vida e assim como todos os irmãos, nós brigamos, discutimos e tivemos nossos desentendimentos pelo nosso caminho, mas isso só serviu para enfrentar os problemas da vida de uma forma mais segura e digna.

Aos meus padrinhos, Anselmo Sfaciotte e Sirlei Sfaciotte, e minha tia Lourdes Dias de Oliveira que sempre foram como meus segundos pais durante toda minha vida.

À professora Silvia Cristina Osaki pela paciência, apoio e conselhos fundamentais para a conclusão desse trabalho, além da oportunidade e confiança depositada em mim para finalizar mais essa etapa da minha vida.

À professora Sheila Rezler Wosiacki não só pela co-orientação nesse trabalho, mas por tudo que representou na minha vida acadêmica até então, sendo responsável pelo que sou hoje profissionalmente, onde me apoiou, ensinou, aconselhou e serviu de inspiração na escolha que tomei.

À minha amiga mais sincera e que esteve presente em todos os momentos desde que ingressei no meio acadêmico, Lais Suzumura, pela amizade, companheirismo, brincadeiras, festas e por estar presente também nos momentos difíceis.

A um grande amigo que foi de suma importância nessa minha caminhada, Lincoln G. Coronel, pelo apoio, amizade, conselhos e por também sempre estar ao meu lado nos momentos bons e ruins dessa fase.

Aos meus amigos Susana Correa, Manoela Franco, Renata Ono e Guilherme Amaro, que cultivo desde o colégio e que sempre estiveram comigo apesar da distância.

Aos amigos, Jessica Bordin, Renata Carvalho, Gabriela Vasques, Camila Fiorato, Leandro Yamamoto e Heitor Kawase pela importância que cada um teve nesses anos todos.

Aos amigos que aqui fiz e que foram de extrema importância para minha adaptação em uma cidade onde não conhecia ninguém, principalmente a Alessandra Snak, Rosangela Ziech, Mallu Jagnow Sereno e Rubia Macedo.

E por fim, mas não menos importantes, a todos os meus familiares que me apoiaram e incentivaram a seguir nessa carreira acadêmica.

Agradeço ao Grupo de Estudo em Saúde pública (GESP) da UFPR, setor Palotina que ajudou financeiramente a elaboração desse projeto.



## RESUMO

A resistência antimicrobiana, condição ao qual um micro-organismo é capaz de sobreviver à exposição a um agente antimicrobiano, é um problema complexo que envolve várias espécies de bactérias, mecanismos de resistências, mecanismos de transferência e reservatórios. Em animais de companhia, os antimicrobianos são usados na prevenção e no tratamento de doenças infecciosas. O grande uso destes agentes, e muitas vezes de forma incorreta, na rotina veterinária tornam os cães e gatos uma potencial fonte de difusão de resistência antimicrobiana devido ao contato muito próximo desses animais com o homem, podendo levar à transmissão de bactérias multirresistentes e zoonóticas, além da transferência indireta de genes de resistência entre bactérias presentes na microbiota humana e animal. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar estirpes bacterianas em amostras obtidas de infecções clínicas e cirúrgicas de cães e gatos na medicina veterinária, investigando a presença de características fenotípicas e genotípicas de resistência a drogas antimicrobianas. Foram realizados três estudos distintos. No primeiro, patógenos bacterianos de 77 infecções caninas foram isolados, identificados e avaliados fenotipicamente para resistência antibacteriana. Foi possível identificar 100 isolados bacterianos sendo 61 Gram positivos, com 55 *Staphylococcus* spp., e 39 Gram negativos (36 fermentadores e três não fermentadores). 73 isolados foram considerados multirresistentes pela avaliação individual das drogas e 74 pela avaliação das classes. Apenas cinco isolados mostraram-se sensíveis a todas as drogas. Dois isolados foram resistentes a todas as classes, sendo isoladamente, sensíveis a alguns antimicrobianos. Das 55 amostras de *Staphylococcus* spp., 36 (65,45%) foram identificadas como MRS, fenotipicamente, 80,56% (29/36) indicam a presença do gene *mecA*, 5,56% (2/36) do gene *mecC* e 13,89% (5/36) como hiperprodutoras de beta-lactamase. Dois isolados de *Enterococcus* spp. foram considerados resistentes a vancomicina (VRE). 61,54% (24/39) das amostras foram positivas no teste presuntivo para detecção de ESBL. No segundo estudo foram avaliados 26 isolados bacterianos provenientes de 18 afecções oftálmicas de animais de companhia. Foram caracterizados 18 *Staphylococcus* spp., um *Enterococcus* spp., e sete Gram negativos (seis fermentadores e dois não fermentadores). Um total de 738 avaliações de drogas antimicrobianas foram realizadas, onde o percentual de drogas consideradas resistentes ou com

resistência intermediária *in vitro* foi de 42,82% (n=316). Considerando as drogas antimicrobianas isoladas, 18 isolados mostraram-se multirresistentes, enquanto que pela avaliação da resistência às classes, 20 isolados foram considerados multirresistentes. A detecção fenotípica de MRS mostrou 61,11% (11/18) dos isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina, enquanto que a detecção genotípica, 38,89% (7/18) foram carreadores do gene *mecA*. Foram detectados isolados multirresistentes de MRS, MRS-MLSb e ESBL. No terceiro estudo, 80 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos, identificados como *S. pseudointermedius*, foram avaliados pela disco-difusão com oxacilina e cefoxitina e amplificação por PCR de um fragmento do gene *mecA*, para caracterização de estirpes de MRS. 2285 avaliações de drogas antimicrobianas foram realizadas, onde 931 (40,74%) dos teste apresentaram resistência parcial ou total. Na detecção fenotípica de MRS, 58,75% (47/80) dos isolados apresentaram resistência à oxacilina e 53,75% (43/80) à cefoxitina. Na detecção genotípica, o gene *mecA* foi encontrado em 23 (28,75%) dos isolados. Avaliando-se a os isolados MRS e MSS, amostras *mecA* positivas e negativas com resistência a oxacilina e/ou cefoxitina, apresentaram tanto o MAR quanto o MCAR superiores aos isolados sensíveis a oxacilina/cefotina, sendo a detecção fenotípica mais sensível no quesito resistência múltipla a antimicrobianos ou classes. Os resultados para todos os antimicrobianos testados mostraram-se bastante homogêneo para amostras MRS detectadas de forma fenotípica, porém não para a detecção genotípica, no entanto, apesar da presença do gene, este pode não estar sendo expresso fenotipicamente. Os resultados do presente trabalho demonstram a necessidade do monitoramento constante do perfil de resistência bacteriana, que varia ao longo dos anos e difere de local para local. A realização de testes para identificação bacteriana e sua suscetibilidade podem auxiliar na seleção apropriada do agente antimicrobiano, mostrando-se essencial para a clínica médica e cirúrgica devido a altas taxas de resistência bacteriana verificadas, assim como o monitoramento da resistência local com o uso contínuo de determinadas drogas antimicrobianas.

**Palavras-chave:** antibióticos, micro-organismos, multirresistência, susceptibilidade

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance, a condition to which a microorganism is able to survive exposure to an antimicrobial agent, is a complex problem involving several species of bacteria, mechanisms of resistance, mechanisms of transfer and reservoirs. In companion animals, the antimicrobial agents are used in the prevention and treatment of infectious diseases. The widespread use of these agents, and often incorrectly, in veterinary routine make dogs and cats a potential source of spread of antimicrobial resistance due to the close contact of these animals with man, can lead to the transmission of multiresistant bacteria and zoonotic, addition to the indirect transfer of resistance genes between bacteria in human and animal microbiota. The aim of this study was to isolate and identify bacterial strains in samples obtained from clinical and surgical infections of dogs and cats in veterinary medicine, investigating the presence of phenotypic and genotypic characteristics of resistance to antimicrobial drugs. Three separate studies were conducted. In the first, 77 bacterial pathogens of canine infections were isolated, identified and evaluated phenotypically for antibacterial resistance. It was possible to identify 100 bacterial isolates whom 61 gram positive, with 55 *Staphylococcus* spp., and 39 gram negative (36 fermenters and three non-fermenters). 73 multiresistant isolates were considered by individual assessment of drugs and 74 of the evaluation of classes. Only five isolates were susceptible to all drugs. Two isolates were resistant to all classes, being alone, sensitive to some antibiotics. Of the 55 strains of *Staphylococcus* spp., 36 (65.45%) were identified as MRS, phenotypically, 80.56% (29/36) indicate the presence of the *mecA* gene, 5.56% (2/36) of the *mecC* gene and 13.89% (5/36) as a hyper-producing beta-lactamase. Two isolates of *Enterococcus* spp. were resistant to vancomycin (VRE). 61.54% (24/39) of samples were positive in the presumptive test for ESBL detection. In the second study evaluated 26 bacterial isolates from 18 ophthalmic diseases of pet animals. Were characterized 18 *Staphylococcus* spp., one *Enterococcus* spp., and seven gram negative (six fermenters and two non-fermenters). A total of 738 reviews of antimicrobial drugs were conducted where the percentage of drug found resistant or intermediately resistant strains *in vitro* was 42.82% (n = 316). Considering the isolated antimicrobial drugs, 18 isolates showed multiresistant, while the evaluation of resistance to classes, 20 isolates were considered multiresistant. Phenotypic detection of MRS showed 61.11% (11/18)

isolates of *Staphylococcus* spp. methicillin-resistant, whereas the genotypic detection 38.89% (7/18) were carrying the *mecA* gene. multiresistant isolates were detected MRS, MRS and ESBL-MLSB. In the third study, 80 *Staphylococcus* spp. coagulase positive, identified as *S. pseudintermedius* were evaluated by disk diffusion oxacillin and ceftiofur and PCR amplification of a fragment of the *mecA* gene, for the characterization of strains MRS. 2285 reviews of antimicrobial drugs were conducted, where 931 (40.74%) of the test showed partial or total resistance. In phenotypic detection of MRS, 58.75% (47/80) of the isolates were resistant to oxacillin and 53.75% (43/80) to ceftiofur. In genotypic detection, the *mecA* gene was found in 23 (28.75%) isolates. Evaluating the MRS and the MSS isolated, positive and negative samples with resistance to oxacillin and / or ceftiofur *mecA* showed both the MAR and MCAR higher sensitive to oxacillin / ceftiofur isolated, being the most sensitive phenotypic detection in the question multiple resistance antimicrobials or classes. The results for all antibiotics tested were quite homogeneous samples to MRS detected phenotypic form but not for the genotypic detection, however, despite the presence of the gene, it might not being phenotypically expressed. The results of this study demonstrate the need for constant monitoring of bacterial resistance profile that varies over the years and differs from place to place. The testing for bacterial identification and susceptibility can assist in your selection of the appropriate antimicrobial agent, being essential for the medical and surgical due to high rates of bacterial resistance observed, as well as monitoring of local resistance to the continued use of certain antimicrobials.

**Keywords:** antibiotics, micro-organisms, multidrug resistance, susceptibility

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	- <i>Brian heart infusion</i>
CA-MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente cepa comunitária
CCR	- <i>Cassete Chromosome Recombinases</i>
CDC	- <i>Centers of Disease Control and Prevention</i>
CIA	- Clorofórmio/Álcool-Isoamílico
CIM	- Concentração inibitória mínima
CLSI	- <i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
CTAB	- Brometo de Cetil Trimetil Amônio
ECDC	- <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EPI	- Equipamentos de proteção individual
ESBL	- espectro estendido a beta-lactamase
EUA	- Estados Unidos da América
EUCAST	- <i>European Committee and Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
HA-MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente cepa hospitalar
HV	- Hospital Veterinário
hVISA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistência intermediária a vancomicina cepa heterogênea
LA-MRSA	- <i>Livestock-associated MRSA</i>
MAR	- Resistência múltipla antimicrobiana
MCAR	- Resistência múltipla as classes antimicrobianas
MH	- Mueller Hinton
MIC	- <i>Minimal inhibitory concentration</i>
MLSb	- Macrolídeos, Lincosaminas e Streptograminas b
MRS	- <i>Staphylococcus</i> metilicina resistente
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente
MRSP	- <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> metilicina resistente
MSS	- <i>Staphylococcus</i> sensível à metilicina
MSSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> sensível à metilicina
MSSP	- <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> sensível à metilicina

OMS	- Organização Mundial da Saúde
ORS	- <i>Staphylococcus</i> spp. oxacilina-resistente
PABA	- ácido paraminobenzoico
PBP	- <i>Penicillin binding proteins</i>
PCA	- Ágar padrão de contagem
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PVL	- <i>Pantín Valentine Leucocidine</i>
SCC <sub>mec</sub>	- <i>staphylococcal cassette chromossome mec</i>
SCN	- <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
SCP	- <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo
SIG	- Grupo <i>Staphylococcus intermedius</i>
TE	- Tris/EDTA
TSA	- Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos
UEM	- Universidade Estadual de Maringá
UFC	- Unidade formadora de colônia
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
VISA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistência intermediária a vancomicina
VRE	- <i>Enterococcus</i> vancomicina resistente
VRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação de bactérias gram positivas multirresistentes de importância em saúde pública e resistência antimicrobiana relacionada à identificação.....	28
Tabela 2: Estudos de detecção do gene <i>mecA</i> em espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. de origem animal.....	33
Tabela 3: Lista de antimicrobianos testados de acordo com a classe e sua respectiva concentração.....	60
Tabela 4: Distribuição em frequência total e frequência de MAR $\geq$ 0.2 das cepas bacterianas encontradas nos diferentes sistemas orgânicos caninos com infecção. ....	62
Tabela 5: Distribuição em frequência, índice MAR médio e frequência de bactérias multirresistentes encontrados em isolados bacterianas obtidas de infecções de cães do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá.....	63
Tabela 6: Lista de antimicrobianos testados de acordo com a classe e sua respectiva concentração.....	81
Tabela 7: Distribuição em frequência, porcentagem e índice MAR médio encontrados em isolados bacterianos obtidos de animais de companhia com afecções oculares externas do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá. ....	83
Tabela 8: Amostras de <i>Staphylococcus</i> meticilina resistente (MRS) e seus resultados frente aos antimicrobianos oxacilina e cefoxitina, resultado da detecção do gene <i>mecA</i> através da PCR e o índice MAR de cada um.....	85
Tabela 9: Distribuição em frequência total e frequência de MAR $\geq$ 0.2 de isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva encontrados nos diferentes sistemas orgânicos caninos e felinos com infecção.....	108
Tabela 10: Análise da sensibilidade das técnicas de detecção fenotípica de MRS por disco-difusão com oxacilina e detecção genotípica de MRS por PCR para o gene <i>mecA</i> . ....	109
Tabela 11: Análise da sensibilidade das técnicas de detecção fenotípica de MRS por disco-difusão com cefoxitina e detecção genotípica de MRS por PCR para o gene <i>mecA</i> . ....	109
Tabela 12: Perfil de resistência fenotípica a drogas antibacterianas de amostras MRS e MSS detectadas de forma fenotípica (OXA/CFO) e genotípica ( <i>mecA</i> ) .....	110

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Transferência de material genético entre bactérias através da conjugação, onde ocorre a mobilização plasmidial. ....	20
Figura 2: Troca de material genético através da transdução, onde há a presença de um bacteriófago.....	21
Figura 3: Transferência do material genético através da transformação.....	21
Figura 4: Representação dos mecanismos de resistência bacterianos frente aos antimicrobianos. A - mecanismo de bomba de efluxo. B - mecanismo de diminuição da permeabilidade da parede celular (perda de porina). C - mecanismo de alteração no alvo de ação. D - mecanismo de degradação enzimática do antimicrobiano. ....	22
Figura 5: Detecção de isolados ESBL através da presença de halo fantasma (círculos vermelhos) entre amoxicilina+clavulonato e aztreonam, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona e cefepima. ....	67
Figura 6: Detecção do gene <i>mecA</i> em amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de afecções oftálmicas em cães e gatos no hospital veterinário da Universidade Estadual de Maringá, <i>Campus</i> Umuarama. A canaleta 1 indica o marcador, a canaleta de número 2 o controle positivo (ATCC 43300), canaleta 3 o controle negativo, as canaletas 4, 5 , 7 , 11 e 12 indicam amostras positivas para o gene <i>mecA</i> , enquanto as canaletas 6, 8, 9, 10, 13 e 14 amostras negativas. ....	85
Figura 7: Teste da Coagulase em tubo com a formação de coágulos, indicando a positividade do teste.....	107



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1. Objetivo geral .....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
3.1. Resistencia antimicrobiana.....	20
3.2. Referências.....	24
<b>4. CAPÍTULO 1 - RESISTÊNCIA BACTERIANA EM GRAM POSITIVAS DE INTERESSE EM SAÚDE ANIMAL E PÚBLICA .....</b>	<b>26</b>
4.1. RESUMO .....	26
4.2. Introdução.....	27
4.3. <i>Staphylococcus</i> meticilina resistente (MRS) .....	29
4.4. <i>Staphylococcus aureus</i> resistência intermediária/resistente à vancomicina (VISA/VRSA).....	35
4.5. <i>Staphylococcus</i> spp resistente aos Macrolídeos, Lincosamidas e Streptogramineas B (MLSb).....	37
4.6. <i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina (VRE) .....	38
4.7. Referências.....	42
<b>5. CAPÍTULO 2 - PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS BACTERIANOS DE INFECÇÕES CLÍNICAS CANINAS .....</b>	<b>57</b>
5.1. RESUMO .....	57
5.2. Introdução.....	58
5.3. Material e Métodos.....	60
5.4. Resultados e Discussão .....	62
5.5. Conclusão.....	71
5.6. Referências.....	72
<b>6. CAPÍTULO 3 - PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE PATÓGENOS BACTERIANOS DE PEQUENOS ANIMAIS COM DOENÇA OCULAR EXTERNA .....</b>	<b>77</b>
6.1. RESUMO .....	77
6.2. Introdução.....	78

6.3. Material e Métodos .....	80
6.4. Resultados e Discussão .....	83
6.5. Conclusão .....	93
6.6. Referências .....	94
<b>7. CAPÍTULO 4 – DETECÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS MRS MULTIRRESISTENTES ISOLADOS DE PEQUENOS ANIMAIS .....</b>	<b>101</b>
7.1. RESUMO .....	101
7.2. Introdução .....	102
7.3. Material e Métodos .....	104
7.4. Resultados e discussão .....	107
7.5. Conclusão .....	114
7.6. Referências .....	114
<b>8. CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>119</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A resistência bacteriana é um problema complexo que envolve várias espécies de bactérias, mecanismos de resistências, mecanismos de transferência e reservatórios. Em animais de companhia, os antimicrobianos são usados na prevenção e no tratamento de doenças infecciosas, principalmente em otite externa, infecções de pele, respiratórias e urinárias, além de serem usados na profilaxia cirúrgica. O grande uso destes agentes, e muitas vezes de forma incorreta, na rotina veterinária tornam os cães e gatos uma potencial fonte de difusão de resistência antimicrobiana devido ao contato muito próximo desses animais com o homem, podendo levar à transmissão de bactérias multirresistentes e zoonóticas, além da transferência indireta de genes de resistência entre bactérias presentes na microbiota humana e animal.

Existem várias técnicas destinadas à determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro*, também conhecidas como Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA), porém a mais difundida e utilizada é a técnica de disco difusão, descrita inicialmente por Kirby e Bauer, que apresenta grande praticidade, confiabilidade e baixo custo. Por esta técnica, é possível identificar fenotipicamente os principais micro-organismos multirresistentes, entre eles: *Staphylococcus* meticilina resistente (MRS), *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE), e as bactérias gram negativas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), além de estabelecer o perfil de sensibilidade desses micro-organismos frente às classes de antimicrobianos.

O estudo da resistência antimicrobiana é um tema de grande importância na comunidade médica e governamental, já conta com pesquisas extensas de conscientização para o uso de antimicrobianos na área humana. Na medicina veterinária, porém, ainda é tratado como “tabu”, uma vez que os TSA são demorados e não disponíveis em grande parte das clínicas veterinárias. Poucos são os médicos veterinários que percebem a grande ferramenta de trabalho dos TSA, que diminuem o tempo de tratamento, os gastos e melhoram a resposta clínica a terapia antimicrobiana.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Isolar e identificar estirpes bacterianas em amostras obtidas de infecções clínicas e cirúrgicas de cães e gatos na medicina veterinária, investigando a presença de características fenotípicas e genotípicas de resistência a drogas antimicrobianas.

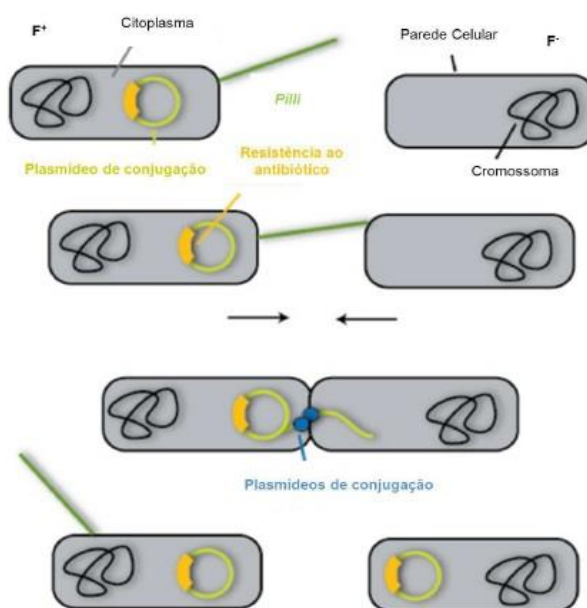
### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar patógenos bacterianos de diferentes infecções de animais de companhia;
- Avaliar o perfil de resistência fenotípica dos patógenos bacterianos identificados;
- Detectar cepas com características fenotípicas de multirresistência;
- Detectar cepas com características fenotípicas de betalactamase de espectro estendido (ESBL);
- Detectar cepas com características fenotípicas de *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE);
- Detectar cepas de *Staphylococcus* resistentes a meticilina/oxacilina (MRS) por características fenotípicas e genotípicas
- Avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* resistentes (MRS) e sensíveis (MSS) a meticilina/oxacilina.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

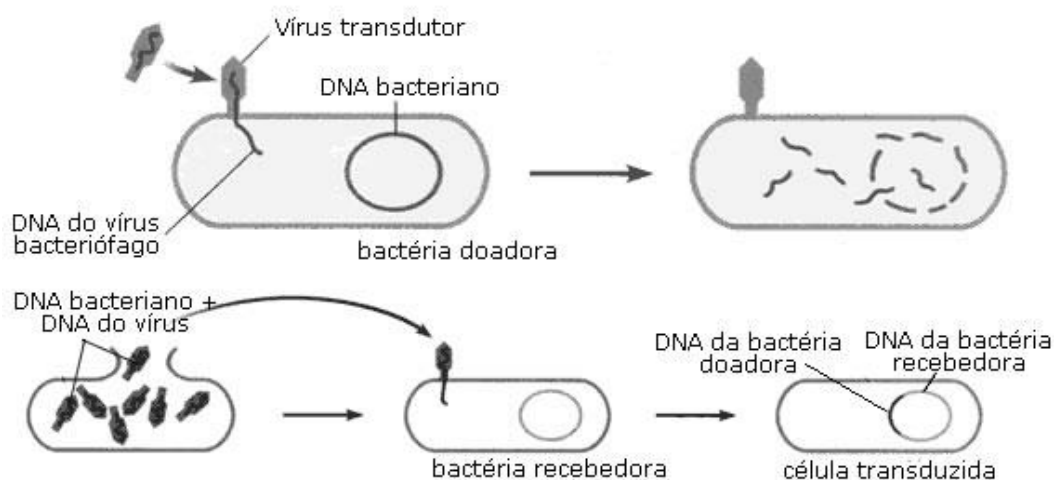
#### 3.1. Resistencia antimicrobiana

A resistência antimicrobiana é descrita como uma condição ao qual o micro-organismo é capaz de sobreviver à exposição ao antibiótico (BARIE, 2012), sendo a bactéria capaz de esquivar-se da ação dessas drogas por diversos mecanismos. Essa resistência pode apresentar-se de duas formas: intrínseca e adquirida. A primeira é inerente a espécie bacteriana, sendo que nesses casos, o gene que codifica a resistência é cromossômico, como por exemplo, as bactérias gram negativas que devido à sua estrutura da parede celular são naturalmente resistentes à vancomicina (MADIGAN et al., 2012). A outra forma de resistência, a adquirida, é capaz de alterar a composição genética do micro-organismo através de mutações no DNA cromossômico ou por aquisição de um DNA exógeno, podendo acarretar em características vantajosas para o micro-organismo (JACOBY, 2005). Na resistência adquirida, o mecanismo mais comum de transferência de genes de resistência antimicrobiana é a conjugação (Figura 1), onde ocorre uma mobilização plasmidial por contato direto entre as bactérias ocorrendo a transferência do material genético, porém também pode ocorrer por transdução (Figura 2) ou transformação (Figura 3) (SILVA; KNOBL; MORENO, 2013).



**Figura 1:** Transferência de material genético entre bactérias através da conjugação, onde ocorre a mobilização plasmidial.

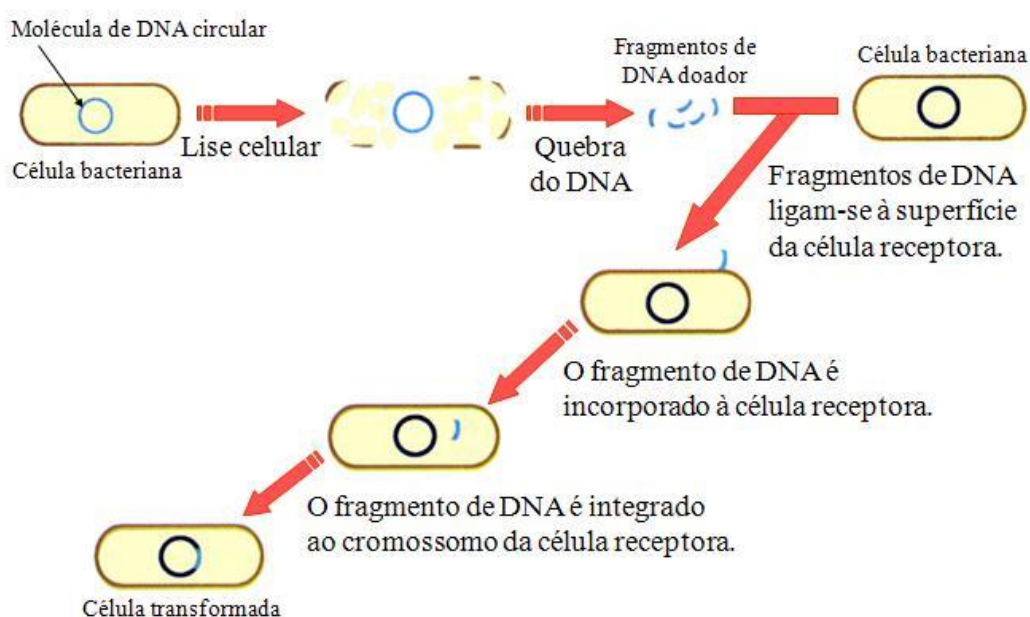
FONTE: [http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Project/General\\_information](http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Project/General_information)



**Figura 2:** Troca de material genético através da transdução, onde há a presença de um bacteriófago.

FONTE: <http://microbiologiaja.blogspot.com.br/2013/genetica-bacteriana.html>

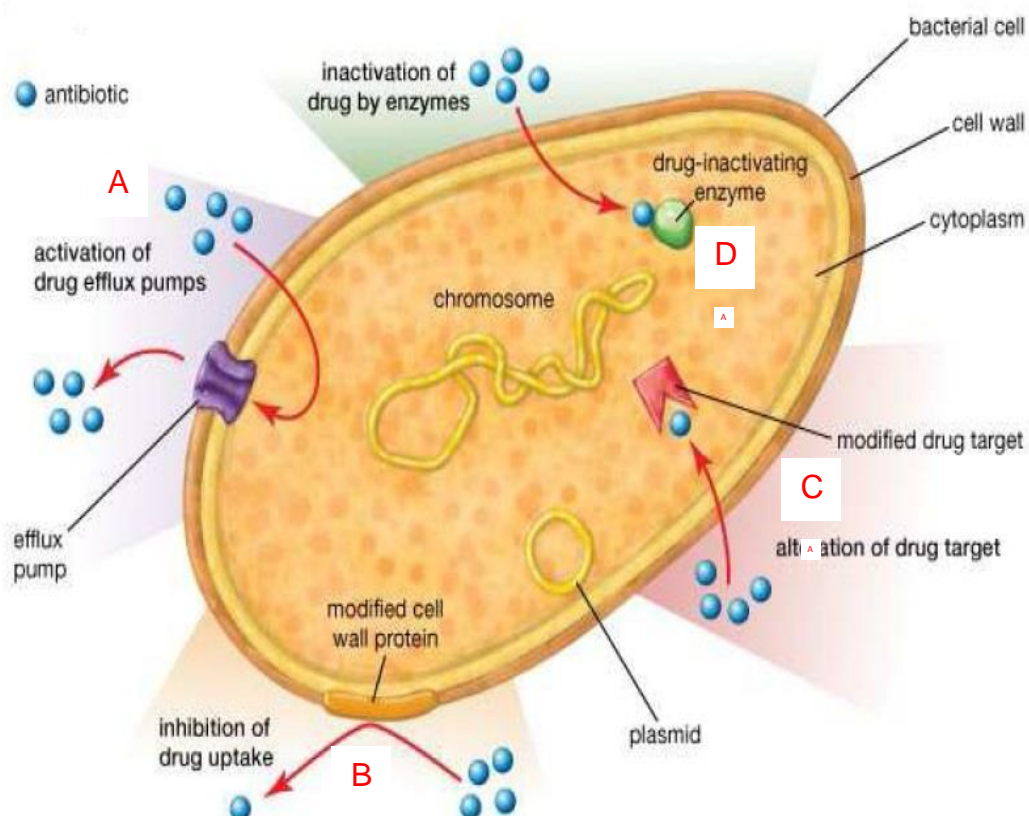
## Transformação



**Figura 3:** Transferência do material genético através da transformação.

FONTE: <http://microbiologiaja.blogspot.com.br/2013/03/genetica-bacteriana.html>

Existem quatro mecanismos principais de resistência bacteriana: bombas de efluxo, diminuição da permeabilidade da membrana (pela perda de porinas), modificação no alvo de ação do antibiótico e a degradação do mesmo (BARIE, 2012), assim como demonstrados na Figura 4.



**Figura 4:** Representação dos mecanismos de resistência bacterianos frente aos antimicrobianos. A - mecanismo de bomba de efluxo. B - mecanismo de diminuição da permeabilidade da parede celular (perda de porina). C - mecanismo de alteração no alvo de ação. D - mecanismo de degradação enzimática do antimicrobiano.

FONTE: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/129670>

A bomba de efluxo diminui a quantidade de droga no meio intracelular através da extrusão para o espaço periplasmático ou diretamente para o meio externo, sendo que algumas bombas de efluxo são capazes de eliminar vários compostos, incluindo detergentes e antimicrobianos de diversas classes (HORIYAMA; YAMAGUCHI; NISHINO, 2010; ALVAREZ-ORTEGA; OLIVARES; MARTÍNEZ, 2013).

As porinas são canais não específicos na membrana externa bacteriana que permite a entrada de substâncias hidrofílicas (incluindo moléculas de antimicrobianos), assim, quando essas porinas perdem suas funções ou por alguma

repressão genética que resulta na perda de porinas, ocorre uma diminuição na permeabilidade da membrana, resultando em resistência, sendo que essa resistência pode ser conferida a uma variedade de agentes antimicrobianos (NIKAIDO; PAGÉS, 2012).

A modificação do alvo de ação de antimicrobianos refere-se à aquisição de genes que codificam novos produtos resistentes a antimicrobianos, acarretando na substituição do alvo. Este fato é observado no gênero *Staphylococcus*, onde ocorre a produção de uma proteína ligadora de penicilina adicional (PBP2a ou PBP2'), uma proteína ligante de penicilina de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA* que atua como transpeptidase retomando as funções da síntese de parede celular quando as outras PBPs estão inibidas, garantindo a integridade da célula bacteriana na presença de agentes beta-lactâmicos (CASTELLANO-GONZALEZ et al., 2009; HIRAMATSU, 2002).

A degradação do antimicrobiano por enzimas é o mecanismo de resistência mais frequente e importante, sendo descrito como o principal problema global em unidades de saúde e nas comunidades. Esse mecanismo se dá pela produção de enzimas que modificam ou destroem as estruturas químicas dos antimicrobianos, o que acarreta na perda de sua ação (SILVA; KNOBL; MORENO, 2013). Em bactérias gram negativas, a enzima beta-lactamase tem sido identificada como o principal problema no surgimento de resistência (HAWKEY; JONES, 2013), sendo conferida resistência às penicilinas, cefens, monobactâmicos, cefalosporinas e carbapenêmicos, considerados os principais antimicrobianos no tratamento de infecções por bactérias gram negativas (BUSH, 2013).

Recentemente, especialistas internacionais do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos e do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) criaram uma terminologia padrão ao qual descreve os perfis de resistência em micro-organismos associados aos cuidados da saúde, além de publicarem listas de antibióticos para testes de sensibilidade. De acordo com esses especialistas, micro-organismos multirresistentes são definidos como aqueles resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano de três classes distintas e já cepas pan resistentes são aquelas não susceptíveis a todos os antimicrobianos em todas as classes (MAGIORAKOS et al., 2012).

Alguns gêneros bacterianos tornam-se mais facilmente resistentes a determinadas classes de antimicrobianos do que outras, como por exemplo, os



micro-organismos Gram positivos do gênero *Staphylococcus* spp e *Enterococcus* spp, e as bactérias gram negativas da família das *Enterobacteriaceae* e da espécie *Pseudomonas aeruginosa* (BOGAARD; STOBBERINGH, 2000; MAGIORKAS et al., 2012).

Algumas medidas são de suma importância para a diminuição da disseminação da resistência antimicrobiana, tais como: educação dos profissionais da saúde (inclusive o médico veterinário), cultura microbiológica de segurança, isolamento de pacientes infectados, utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), desinfecção de superfícies, restrição no uso de antimicrobianos e higienização das mãos (OLIVEIRA e SILVA, 2008). Duas medidas que vêm dando resultado para impedir a disseminação da resistência é a rotação antimicrobiana no ambiente hospitalar (BROWN; NATHWANI, 2005) e a terapia combinada com drogas sinérgicas (LANDERS et al., 2012).

Na medicina humana assim como na medicina veterinária, a disseminação de fenótipos resistentes é de grande preocupação, uma vez que restringe as opções terapêuticas no tratamento de cepas multirresistentes, também chamadas de “superbactérias” (SILVA; KNOBL; MORENO, 2013). Na medicina humana é lei que um hospital tenha um programa de controle de infecção bem estabelecido, tal fato não é visto em hospitais veterinários, assim, há uma necessidade muito real de se estabelecer um programa bem definido a fim de reduzir significativamente a ocorrência de infecções hospitalares, minimizando a exposição dos funcionários do hospital a patógenos zoonóticos e diminuindo a disseminação de micro-organismos multirresistentes para a comunidade (GUARDABASSI, 2012).

### 3.2. Referências

- ALVAREZ-ORTEGA, C.; OLIVARES, J.; MARTÍNEZ, J. L. RND multidrug efflux pumps: what are they good for? **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 1-11, 2013.
- BARIE, P. S. Multidrug-resistant organisms and antibiotic management. **Surgical Clinics North America**, v. 92, n. 2, p. 345-391, 2012.
- BROWN, E. M.; NATHWANI, D. Antibiotic cycling or rotation: a systematic review of the evidence of efficacy. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 6-9, 2005.
- BUSH, K. Proliferation and significance of clinically relevant B-lactamases. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1277, p. 84-90, 2013.

CASTELLANO-GONZALEZ, M. J.; PEROZO-MENA, A. J.; VIVAS-VEJA, R. L.; GINESTRE-PEREZ, M. M.; RINCON-VILLALOBOS, G. C. Molecular and phenotypical typification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in a university hospital. **Rev. Chilena. Infectol.**, v.26, p.39-48, 2009.

GUARDABASSI, L. Veterinary hospital-acquired infections: The challenge of MRSA and other multidrug-resistant bacterial infections in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v.193, p.307–308, 2012.

HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. i3-i10, 2013. Supplement, 1.

HIRAMATSU, K., et al. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.292, p.67-74, 2002.

HORIYAMA, T.; YAMAGUCHI, A.; NISHINO, K. TolC dependency of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 7, p. 1372-1376, 2010.

JACOBY, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 41, p. 120-126, 2005. Supplement, 2.

LANDERS T. F.; COHEN, B.; WITTUM, T. E.; LARSON, E. L. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. **Public Health Reports**, v. 127, n. 1, p. 4-22, 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D.; CLARK, D. P. Brock biology of microorganisms. 13th ed. San Francisco: Person Education, 2012.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multi-drug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 268-281, 2012.

NIKAIDO, H.; PAGÉS, J. Broad specificity efflux pump and their role in multidrug resistance of gram negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 340-363, 2012.

OLIVEIRA, A.C. SILVA, R.S. Desafios do cuidar em saúde frente á resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**. v.10, n.1, p.189-197, 2008.

SILVA, K. C; KNÖBL, T.; MORENO, A. M. Antimicrobial resistance in veterinary medicine: mechanisms and bacterial agents with the greatest impact on human health. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 50, n. 3, p. 171-183, 2013.

VAND DE BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 4, p. 327-335, 2000.

## 4. CAPÍTULO 1 - RESISTÊNCIA BACTERIANA EM GRAM POSITIVAS DE INTERESSE EM SAÚDE ANIMAL E PÚBLICA

### 4.1. RESUMO

Dentre os micro-organismos Gram positivos multirresistentes destacam-se, principalmente os *Staphylococcus* spp. metilina resistente (MRS), patógenos considerados oportunistas e relacionados tanto a infecções hospitalares como infecções comunitárias, tendo inúmeros relatos na medicina e um grande aumento de relatos na medicina veterinária, em diversas espécies de animais. MRS são intrinsicamente resistentes a todas as drogas beta-lactâmicas. Os *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária e os resistentes à vancomicina (VISA/VRSA) ainda não foram reportados em animais, porém são necessários estudos mais aprofundados. Os *Staphylococcus* spp. também estão relacionados com resistência aos antimicrobianos do grupo dos Macrolídeos, Lincosamidas e Streptograminas B (MLS<sub>B</sub>), que apesar de serem de classes diferentes, possuem o mesmo mecanismo de ação. Na medicina veterinária, a clindamicina (antimicrobiano da classe da Lincosamida) é amplamente utilizada para tratamentos de infecções de pele, feridas, infecções ósseas, pneumonia, infecção da cavidade oral e infecções causadas por bactérias anaeróbicas, além de ser utilizada em infecções causadas por MRS. Outro gênero de micro-organismos Gram positivos resistente é o *Enterococcus*, sendo os *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE) os de maior importância. Após vários relatos de VRE na medicina veterinária, devido ao grande uso de um antimicrobiano análogo (avoparcina) na produção animal, esse grupo de micro-organismo passou a ter grande destaque, uma vez que a vancomicina é considerada o último recurso para o tratamento de MRS e de *Enterococcus* associados a infecções hospitalares em humanos, das quais já foram também isoladas cepas resistentes. O maior problema destes micro-organismos e seus mecanismos de resistência na medicina veterinária está relacionado ao seu impacto na saúde pública, devido ao contato cada vez mais próximo entre animais e o homem. Com isso, o objetivo dessa revisão foi apontar os principais micro-organismos Gram positivos encontrados na medicina veterinária descrevendo seus mecanismos de ação que levam à resistência aos antimicrobianos, assim como o impacto na saúde pública através do seu potencial zoonótico.

**Palavras-chave:** MLSb, MRS, VRE, VISA, VRSA

## **4.2. Introdução**

A resistência aos antimicrobianos caracteriza-se por um conjunto de condições ao qual um micro-organismo consegue sobreviver quando exposto a uma droga com atividade antimicrobiana. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS / WHO), a resistência antimicrobiana refere-se à resistência de um micro-organismo frente a um medicamento antimicrobiano para o qual foi originalmente sensível. Já Wannmacher (2004) a define por cepas de micro-organismos capazes de multiplicarem-se com a aplicação de doses terapêuticas ou altas concentrações de antimicrobianos.

A evolução de cepas resistentes é um fenômeno natural de seleção que acontece quando micro-organismos são expostos a drogas antimicrobianas, sendo uma característica intrínseca de sobrevivência destas ao meio ambiente. Em 1941, logo após a penicilina ter sido introduzida na medicina, Abrahan e Chain identificaram as primeiras cepas resistentes a essa droga, as quais produziam uma enzima capaz de degradar a penicilina, chamada de penicilinase (UMBER; BENDER, 2009). Junto com a introdução de novas drogas antimicrobianas na prática clínica já se observa a emergência de cepas resistentes. A taxa inicial de desenvolvimento de novas drogas pela indústria farmacêutica e padrões de uso de antimicrobianos foi extremamente elevada, onde após a detecção de cepas resistentes, prontamente novas drogas eram lançadas em sua substituição. Entretanto, a desaceleração natural no desenvolvimento de novas drogas associada à emergência de cepas multirresistentes, trouxe a microbiologia clínica a um patamar crítico, com poucas drogas sensíveis disponíveis, baixo desenvolvimento de novas drogas e cepas já resistentes a múltiplas drogas, dificultando o controle e o tratamento de diversas infecções, principalmente as de origem hospitalar por processos de seleção ambiental (SHEA, 2003; FERNANDES, 2006).

No ambiente hospitalar, os exemplos mais comumente relatados de resistência entre bactérias gram positivas são *Staphylococcus* (principalmente o *Staphylococcus aureus*) e *Enterococcus*, assim como descrito na Tabela 1, porém outros gêneros bacterianos também estão envolvidos, (ÁLVAREZ-LERMA et al., 2007). Existe uma grande variação no padrão de susceptibilidade destes agentes e

esta resistência pode se estender a múltiplos antimicrobianos (MUNÓZ BELLIDO, 2008).

**Tabela 1:** Relação de bactérias gram positivas multirresistentes de importância em saúde pública e resistência antimicrobiana relacionada à identificação

Bactéria	Resistência antimicrobiana relacionada
<b>MRS</b> - <i>Staphylococcus</i> spp. metilina-resistente ou	Oxacilina
<b>ORS</b> - <i>Staphylococcus</i> spp. oxacilina-resistente	
<b>VISA</b> - <i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina, também chamado de	Vancomicina (resistência intermediária)
<b>GISA</b> (referente à classe dos glicopeptídeos)	
<b>VRSA</b> - <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina também chamado GRSA	Vancomicina
<b>VRE</b> - <i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina	Vancomicina
<i>Staphylococcus</i> resistente ao grupo <b>*MLSb</b>	Eritrocina, clindamicina, estreptogamina B

\*MLSb – Macrolídeos, lincosamidas e streptograminas do grupo B.

Para controlar a dispersão de bactérias resistentes devem ser tomadas algumas estratégias, tais como: educação dos profissionais de saúde (incluindo o médico veterinário), isolamentos de pacientes infectados, cultura microbiológica de vigilância, utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), higienização das mãos, desinfecção das superfícies e restrição no uso de antimicrobianos (OLIVEIRA; SILVA, 2008).

Nas últimas décadas, a relação entre proprietário e seus animais de companhia (cães, gatos e cavalos principalmente) vem mudando drasticamente. Hoje, o contato entre humanos e esses animais está muito mais próximo do que há décadas, estes ganhando cada vez mais, o *status* de membro da família em muitos lares (BLOUIN, 2008). Devido ao contato muito próximo desses animais com o homem e o uso indiscriminado dos antimicrobianos na rotina veterinária e na medicina, os cães e os gatos tornam-se uma potencial fonte de difusão de resistência para os humanos, e vice-versa, podendo assim levar a uma transmissão de bactérias multirresistentes interespecíes (GUARDABASSI, 2011; MOYAERT et al., 2006; UMBER; BENDER, 2009). Um estudo especificamente dirigido aos médicos veterinários da área da dermatologia detectou que 5,3% (9 em 171) destes profissionais eram portadores de *Staphylococcus pseudointermedius* resistente a metilina (MRSP) (MORRIS et al., 2010).

Programas de monitoramento nacional da resistência antimicrobiana geralmente não analisam os dados em cães e gatos na maioria dos países (GUARDABASSI, 2011; RANTALA et al., 2004), porém o interesse no estudo da

resistência antimicrobiana em animais aumentou devido ao surgimento de bactérias multirresistentes, como MRSA e MRSP em pequenos animais, tal como demonstrado por Bordin et al (2014), onde foram encontradas 16 estirpes de MRS em amostras de ferida de pequenos animais.

Com isso, essa revisão teve como objetivo mostrar os principais micro-organismos gram-positivos multirresistentes encontrados na medicina veterinária, assim como seus principais mecanismos de ação e impacto na saúde pública.

#### **4.3. *Staphylococcus* meticilina resistente (MRS)**

Nas últimas décadas, tem-se observado a emergência de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos, dentre os quais se destaca o *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina (MRS) com as variações de *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Staphylococcus pseudointermedius* (MRSP). Essas linhagens não são comumente relatadas em animais, com poucos relatos da MRSP. Entretanto, nos últimos anos, há registros de aumento de casos de infecções em animais domésticos.

A resistência estafilocócica às drogas beta-lactâmicas deve-se principalmente a dois mecanismos distintos. O primeiro mecanismo se dá pela produção da enzima extracelular beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, geralmente plasmidial podendo também ser cromossômico, caracterizando uma resistência constitutiva ou regulada pela presença das drogas, utilizando dois genes adjacentes, o *blaI*, repressor da transcrição do *blaZ* e o *blaR1*, anti-repressor (LOWY, 2003). O segundo mecanismo é pela produção de proteína ligadora de penicilina adicional (PBP2a ou PBP2'), uma proteína ligante de penicilina de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA* (CASTELLANO-GONZALEZ et al., 2009). A PBP2a atua como transpeptidase retomando as funções da síntese de parede celular quando as outras PBPs estão inibidas, garantindo a integridade da célula bacteriana na presença de agentes beta-lactâmicos (HIRAMATSU, 2002). Hiramatsu et al. (2001) identificaram os genes *mecR1*, com atividade repressora e o *mecI*, com atividade antirrepressora sobre o gene *mecA*. A expressão do gene *mecA* é constitutiva e/ou induzida por drogas beta-lactâmicas como a oxacilina e cefoxitina (LOWY, 2003).

O gene *mecA* está inserido no cromossomo estafilocócico através de um elemento genético móvel, denominado cassete cromossômico estafilocócico *mec* ("*staphylococcal cassette chromosome mec*" – SCC*mec*) (ENRIGHT, 2003). O

SCC*mec* é composto por diversos elementos genéticos essenciais: o complexo *mec*, composto pela ilha de patogenicidade *IS431*, os genes *mecA* e seus reguladores *mecI* e *mecR1*, e o complexo *ccr* (*Cassete Chromosome Recombinases*), caracterizado pela presença de genes que codificam recombinases. Em todos os tipos de SCC*mec*, a sequência do gene *mecA* é altamente conservada em cepas de *Staphylococcus aureus* (atualmente representados pelo grupo SCP – *Staphylococcus coagulase positivo*) e *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (WELLER 2000; MA et al. 2002). Hoje já são descritos 13 tipos de SCC*mec* e alguns subtipos (DESCLOUX et al., 2008; BLACK et al., 2009; IWG-SCC, 2009). Os elementos SCC*mec* tipos I, II, III e VI estão mais associados a infecções causadas por *Staphylococcus* spp. de origem nosocomiais, enquanto que os tipos IV, V e VII são encontrados com maior frequência em *Staphylococcus* spp. de infecções comunitária (HISATA et al. 2005, KLUYTMANS-VANDEN BERGH e KLUYTMANS, 2006, KONDO et al. 2007, BOYLE-VAVRA e DAUM 2007, DEURENBERG e STABBERINGH, 2009). A análise da presença deste gene contribui como indicativo e auxilia na escolha da melhor terapia antimicrobiana (FERREIRA et al., 2003).

Existem alguns métodos para a detecção dos MRS, e estes incluem desde os tradicionais e preconizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *European Committee and Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), tais como: a) o teste de disco difusão com os discos de oxacilina e cefoxitina em ágar Mueller Hinton (MH); b) o valor da concentração inibitória mínima (CIM) e c) o uso do ágar Screen de oxacilina. Um novo método de detecção dos MRS e já aceito pelo CLSI é o uso das fitas de E-test, com a principal vantagem de fornecer o valor da concentração inibitória mínima (CIM) diretamente. Apesar das técnicas tradicionais, o principal e mais aceito método de detecção dos MRS, chamado “padrão ouro”, é a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), capaz de detectar parte do gene, sendo um método mais rápido e sensível (OLIVEIRA; LENCASTRE, 2002; SCHISLER et al., 2009).

O MRSA é considerado um patógeno hospitalar (HA-MRSA), no entanto, este começou a ser observado a partir da década de 1990, na comunidade, em pacientes saudáveis (VANDENESCH et al., 2003). O primeiro relato de sua forma comunitária (CA-MRSA) ocorreu em 1993 na Austrália, detectado em populações indígenas locais (UDO et al., 1993), já em 2002 ganhou atenção nos Estados Unidos após surtos de infecções cutâneas em atletas de Los Angeles (MMWR, 2003). No Brasil,

os primeiros isolados identificados como CA-MRSA foram similares a clones do encontrado na Austrália e provenientes de uma única cidade, Porto Alegre (RIBEIRO et al., 2005). Posteriormente, um estudo revelou a presença desse mesmo clone em isolados na região Sudeste, no Rio de Janeiro (RIBEIRO et al., 2007).

As cepas de CA-MRSA são responsáveis por grandes taxas de infecção em crianças e adultos jovens, promovendo elevadas taxas de mortalidade (RIBEIRO et al., 2005). A diferença entre as cepas comunitárias e as cepas hospitalares está no cassete cromossômico, cepas HA-MRSA carregam SCCmec dos tipos I, II e III, enquanto que CA-MRSA carregam preferencialmente os tipo IV e V, estes menores e desprovidos de genes acoplados de resistência a outros antimicrobianos, promovendo ao CA-MRSA susceptibilidade à maioria dos antimicrobianos não beta-lactâmicos. A CA-MRSA apresenta a toxina *Pantín Valentine Leucocidine* (PVL), que caracteriza-se por destruir leucócitos e causar danos teciduais graves (LOPES, 2005; VANDENESCH et al., 2003). Em um estudo realizado nos Estados Unidos, 98% dos isolados apresentaram genes codificadores da PVL (MORAN et al., 2006). As características superiores do CA-MRSA podem lhes conferir vantagens seletivas, pois estes possuem maiores taxas de crescimento do que os HA-MRSA (VANDENESCH et al., 2003).

Recentes estudos demonstraram a colonização por cepas de MRS, principalmente em suínos e raramente em outros animais como bovinos e aves, registrada em diversos países, principalmente da Europa. A caracterização molecular revelou que os clones isolados são agrupados com o complexo 398 (CC398), sendo chamados de livestock-associated MRSA (LA-MRSA). LA-MRSA de origem animal tem sido demonstrado com patogênicos para humanos podendo causar infecções graves como endocardite e pneumonia (REISCHL et al., 2009; MONACO et al., 2013).

Desde a primeira descrição de isolamento de MRSA em animais com mastite bovina na Bélgica, por De Vriese et al. (1972) , vem aumentando o número de infecções por este agente, principalmente na Europa, Canadá, Austrália e nos Estados Unidos (WEESE, 2005).

Na medicina veterinária, foi descrita em 2005 uma nova espécie de *Staphylococcus*, associada principalmente a infecções dermatológicas como pioderma, sendo também oportunista em feridas pós-operatórias e otites (WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010; GRIFFETH et al, 2008). Essa descoberta veio por meio de



análises moleculares de isolados de lesões de gato, cachorro, cavalo e papagaio, e, devido ao seu perfil fenotípico ser semelhante tanto ao *S. intermedius* como ao *S. delphini* (uma espécie que acomete golfinhos reportada em 1988 por Varaldo e colaboradores), essa espécie foi “chamada” de *Staphylococcus pseudintermedius* (DEVRIESE et al., 2005), sendo muitas vezes identificada erroneamente como *S. intermedius* ou *S. aureus* pelos resultados da prova da coagulase positiva e outras características bioquímicas (SASAKI et al., 2007; VAN HOOVELS et al., 2006). A importância do *S. pseudintermedius* como agente zoonótico é menor do que a do *S. aureus*, isto porque a colonização de humanos por esse agente é pouco comum, mesmo em indivíduos com contato direto com animais (WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010). Contudo, um estudo realizado na Holanda detectou um terço (15/45) de MRSP a partir de amostras nasais humanas onde existia o contato entre o indivíduo e os animais (cão e gato), além de 44% de amostras ambientais (VAN et al., 2011). No Japão foram encontradas 113 estirpes de MRSP (de 170 testados) e piodermite canina em dois hospitais de referência (KAWAKAMI et al., 2010). Na Alemanha, foi encontrada uma prevalência de 0,8% de MRSP em cães (61/7490), 0,1% em gatos (6/3903) e 0,1% em equídeos (RUSCHER et al., 2009). Em outro estudo, De Lucia et al. (2011) encontraram uma prevalência de 2% de estirpes MRSP na Itália, prevalência essa que é considerada preocupante, visto que apenas em 2007 foi identificada a primeira estirpe MRSP na Europa, mostrando uma rápida disseminação pela população canina.

Na Europa e nos Estados Unidos foi realizado um estudo multicêntrico internacional que avaliou o perfil de resistência de MRSP identificando cepas multirresistentes a todos os antimicrobianos orais utilizados para o tratamento na clínica de pequenos animais, sendo que os antimicrobianos aos quais estas amostras se mostraram susceptíveis não são autorizados para o uso animal nesses países (PERRETEN et al., 2010). As cepas MRSP isoladas, além do gene de resistência para os beta-lactâmicos, *mecA*, também continham vários outros genes de resistência como os relacionados a eritromicina (*ermB*), tetraciclina (*tetM* e *tetK*), gentamicina (*aac6'-Ie-aph2'-Ia*), clindamicina (*ermB* e *lnuA*), trimetoprim (*dhfrG*), estreptomicina (*ant6'-Ia*), kanamicina (*aph3'-III*) e cloramfenicol (*catpC221*) (PERRETEN et al., 2010; DUIJEKEREN et al., 2011).

Recentemente, vários estudos tem identificado a presença do gene *mecA* em diferentes espécies de *Staphylococcus* com origem de isolados animais, tanto

em *Staphylococcus* coagulase positivo como também em espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (CoNS), como mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Estudos de detecção do gene *mecA* em espécies de *Staphylococcus* spp. de origem animal

<b><i>Staphylococcus</i></b>	<b>Espécie animal</b>
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e <i>Staphylococcus aureus</i>	Suínos, bovinos, equinos, aves, ovinos, cães e gatos
<i>S. pseudintermedius</i>	Cães e gatos
<i>S. hyicus</i>	Suínos
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	
<i>S. capitis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. xylosus</i> e <i>S. sciuri</i>	Bovinos
<i>S. epidermidis</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , e <i>S. Sciuri</i>	Galinhas
<i>S. cohnii</i> , <i>S. fleurettii</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. pasteurii</i> , <i>S. saprophyticus</i> , e <i>S. sciuri</i>	Suínos
<i>S. lentus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. vitulinus</i> , <i>S. auricularis</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. kloosii</i> , e <i>S. xylosus</i>	Equinos
<i>S. haemolyticus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. epidermidis</i> , e <i>S. warneri</i>	Cães e gatos

Fonte: adaptado de WENDLANDT et al., 2013.

Em 2007, um estudo epidemiológico de mastite bovina realizado com amostras de tanque de leite no sudoeste da Inglaterra isolou uma cepa de *S. aureus* denominada LGA251, que foi identificada fenotipicamente como MRSA (GARCIA-ALVAREZ et al., 2011a). Na época, esse fato foi totalmente significativo, pois representava a primeira detecção de MRSA no rebanho leiteiro do Reino Unido, todavia, os testes confirmatórios para o gene *mecA* e PBP2a/20 foram repetidamente negativos. Com isso, foi realizado um sequenciamento genômico, revelando que a cepa LGA251 carregava um gene *mecA* homólogo ao *mecA* convencional, com aproximadamente 69% de identidade em nível de DNA e aproximadamente 63% com a proteína PBP2a/20 (GARCIA-ALVAREZ et al., 2011b). Inicialmente esse gene foi denominado de *mecA*<sub>LGA251</sub>, e da mesma forma como o *mecA* convencional, está localizado dentro de um elemento SCC*mec*, sendo submetido ao Grupo de Trabalho sobre a Classificação do SCC*mec* e classificado em 2009 como SCC*mec* tipo XI. Em 2012, o *mecA*<sub>LGA251</sub> foi denominado de *mecC* (ITO et al., 2012). Estudos com amostras estocadas de isolados do Reino Unido e da Dinamarca identificaram mais 65 amostras *mecC* positivas, sendo esses isolados não só de gado de leite, mas também de amostras humanas, dentre as quais encontra-se o mais antigo isolado dinamarquês, uma amostra de sangue humana de

1975. Embora o *mecC* tenha sido recentemente descoberto, ele pode ter causado infecções em humanos por mais de 35 anos (GARCIA-ALVAREZ et al., 2011b).

Tem-se que, assim como as linhagens MRSA convencionais, as estirpes MRSA *mecC* são patógenos altamente versáteis capazes de causar uma grande variedade de infecções, incluindo doenças em várias espécies animais (CUNY et al., 2011; SABAT et al., 2012; HARRISON et al., 2013; MEDHUS et al., 2013; PETHERSON et al., 2012).

Quando identificados fenotipicamente, o MRSA *mecA* apresenta resistência à oxacilina e cefoxitina. Já a maioria das amostras MRSA *mecC* apresentam resistência à cefoxitina, porém sensibilidade à oxacilina, dado esse comprovado com um estudo realizado com 896 isolados de *S. aureus* (MRSA *mecA*, MRSA *mecC* e *mec*-negativo MSSA) onde foi encontrado 88,7% de sensibilidade e 99,5% de especificidade para esse perfil de resistência (CARTWRIGHT et al., 2013), o que demonstra que a proteína PBP2a *mecC*-codificado, ao contrário do homólogo *mecA*-codificado, tem uma maior afinidade à oxacilina que à cefoxitina, levando a níveis mais elevados de resistência à cefoxitina que a oxacilina (KIM et al., 2012).

Estes e outros dados epidemiológicos indicam a alta taxa de transferência de resistência entre bactérias presentes nos animais para as bactérias presentes nos seres humanos, o que evidencia ainda mais as precauções de higiene sempre que houver a colonização e infecção em animais e médicos veterinários a fim de limitar a propagação da epidemia desta bactéria (BOND; LOEFFLER, 2012).

Na medicina veterinária, cepas MRSP multirresistentes representam desafio para terapia antimicrobiana devido às poucas opções de tratamento, levando os veterinários a utilizarem antimicrobianos usados para o tratamento com fármacos modernos da linha humana, o que levanta questões éticas (WEESE; DUIJKEREN, 2010). O uso em medicina veterinária de drogas como a vancomicina e linezolida que são a única escolha para tratamento de MRS em humanos é questionável, devido ao fato da transferência de genes de resistência poder ocorrer entre cepas e espécies diferentes de estafilococos (PERRETEN et al., 2010).

#### **4.4. *Staphylococcus aureus* resistência intermediária/resistente à vancomicina (VISA/VRSA)**

Após a descoberta de bactérias gram positivas multirresistente, principalmente os MRS, os antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina, tem sido, por muitos anos, a última alternativa para o tratamento desses micro-organismos (WHO, 2009). Todavia, no início dos anos 90, cepas de *S. aureus* resistente *in vivo* (falha na terapia) a teicoplanina foram reportadas nos EUA e Europa. Os testes *in vitro* destas estirpes mostraram sensibilidade à vancomicina pelos testes de diluição (concentração inibitória mínima – CIM ou *minimal inhibitory concentration* - MIC) (MANQUAT et al., 1992; KAATZ et al., 1990). Em 1997, no Japão, foram isoladas as primeiras cepas de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida à vancomicina (VISA), acarretando em uma preocupação significativa sobre o futuro da terapia de infecções estafilocócicas (HIRAMATSU et al., 1997b).

Outros isolados de *Staphylococcus aureus* apresentaram uma resistência heterogênea à vancomicina, sendo denominados hVISA, com característica de CIM à vancomicina dentro da faixa de susceptíveis, porém, quando feitos testes mais detalhados com inóculos mais elevados ou uma incubação prolongada, detectou-se subpopulações com CIM superiores, e consequentemente, resistentes à vancomicina (HIRAMATSU, 2001). Essas descobertas despertaram interesse a respeito da resistência estafilocócica à vancomicina, levando ao isolamento e caracterização de VISA e hVISA em muitos países ao redor do mundo (HOWDEN et al., 2010). Foram feitas também análises retrospectivas de amostras, detectando vários isolados VISA e hVISA, isolados inicialmente antes da permissão do uso da vancomicina (ROBERT et al., 2006; RYBAK et al., 2005; YAMAKAWA et al., 2012).

Devido ao fato de uma maior pressão seletiva ocorrer no ambiente hospitalar, a maioria dos hVISA e VISA são relatadas em cepas HA-MRSA, ao invés de isolados CA-MRSA, no entanto, VISA também tem sido raramente relatado em amostras de *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) (PILLAI et al., 2009) e clones de CA-MRSA (GARDETE et al., 2012).

Segundo Sousa (2006), estirpes de *Staphylococcus* que são resistentes à vancomicina geralmente apresentam resistência à teicoplanina, porém, o contrário

não é verificado, sendo descritas algumas cepas de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* teicoplanina resistentes, mas susceptíveis à vancomicina.

Em 2002, foi isolada a primeira amostra de *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina, em Michigan, EUA, de um paciente em diálise (CHANG et al., 2003), sendo esse isolado o primeiro a possuir o gene *vanA*, gene esse que causa resistência à vancomicina e teicoplanina em *Enterococcus faecalis* (SOUSA, 2006). A origem desta estirpe pode ser explicada pela transferência conjugativa desse gene entre *Enterococcus* e *Staphylococcus* (WEESE, 2005). Em Portugal, Melo et al. (2013), reportaram o primeiro caso de infecção por VRSA em humanos da Europa.

Conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), para se detectar cepas VISA e VRSA, deve-se realizar CIM ou teste em ágar *Screen* para vancomicina descrito para *Enterococcus*. Essas cepas não são detectadas pela técnica de disco-difusão, mesmo com 24 horas de incubação.

Para que os micro-organismos gram-positivos se multipliquem em um ambiente onde a pressão osmótica externa seja inferior a da sua célula, eles precisam sintetizar uma estrutura extracelular forte para evitar sua ruptura. Essa estrutura, chamada peptidoglicano, começa a ser sintetizada no interior da célula (monômero de mureína) e depois transferida para o lado de fora. Assim como os beta-lactâmicos, os antibióticos da classe dos glicopeptídeos exercem a sua função por inibição da síntese da parede celular bacteriana, através da ligação com elevada afinidade, ao terminal D-alanil-D-alanina das unidades precursoras da parede celular (HIRAMATSU, 2001). O espessamento da parede celular é tido como um pré-requisito para a resistência à vancomicina (CUI et al., 2003; HIRAMATSU, 2001), no entanto, quando há uma diminuição de peptidoglicano e um elevado teor de resíduos livres de D-alanil-D-alanina, pode acarretar em um aumento da resistência da estirpe (CUI et al., 2000; REIPERT et al., 2003). As estirpes que possuem o gene *vanA* tem a capacidade de produzir uma ligase D-alanil-D-alanina diferente, o que leva a uma alteração da cadeia lateral do peptidoglicano, havendo menor afinidade para este grupo de antibióticos (FLUIT et al., 2001).

Na medicina veterinária, devido ao pouco uso, a resistência aos glicopeptídeos tem sido pouco estudada (MONCHIQUE, 2013), sendo que em um trabalho realizado por Haenni et al. (2010), foram estudados 60 *Staphylococcus* em cavalos (59 *S. aureus* e 1 *S. pseudintermedius*), nenhum isolado se apresentou

resistente à teicoplanina e nem à vancomicina. Assim, ainda não foram reportadas cepas VRSA na medicina veterinária (MONCHIQUE, 2013).

De acordo com Kirst et al. (1998), a avoparcina, droga antimicrobiana da classe dos glicopeptídeos, foi usada amplamente como promotor de crescimento em animais de produção, tornando assim uma possível fonte de organismos resistentes e disseminadores dessa classe de antimicrobianos, principalmente em animais de produção.

#### **4.5. *Staphylococcus* spp resistente aos Macrolídeos, Lincosamidas e Streptogramineas B (MLSb)**

Macrolídeos (estreptomicina), Lincosamidas (clindamicina) e Streptogramina B (quinupristin/dalfopristina) formam o grupo MLSb de antibióticos, pois apesar de possuírem fórmulas diferentes, apresentam o mesmo mecanismo de ação, inibindo a síntese proteica através da ligação ao receptor 23S do rRNA que faz parte da subunidade 50S do ribossomo bacteriano (ROSSI; ANDREAZZI, 2005; LECLERCQ, 2002).

A resistência aos MLSb pode ocorrer de duas formas: a primeira é por efluxo ativo codificado pelo gene *msrA* e a segunda através da metilação do sítio alvo do ribossomo bacteriano codificadas pelos genes *erm* (LECLERCQ, 2002). Esse último mecanismo pode se apresentar de duas formas: constitutivo, quando sempre há a produção de metilase e o fenótipo de resistência é demonstrado a todo o grupo MLSb; ou de forma induzível, quando a metilase é produzida apenas na presença do indutor (STEWART et al., 2005). Na resistência induzida, os genes envolvidos são os *erm* A, B ou C sendo carregados pelo transposon Tn554 (MCDOUGAL et al., 2003). Outros dois genes foram descritos em isolados animais, o *mphC* (macrolídeo-C-fosfotransferase) isolado a partir de cães e gatos (LÜTHJE et al., 2007) e o *InuA* (nucleotídeo-transferase lincosamida) isolado de casos de mastite subclínica em bovinos (LOEZA-LARA et al., 2004).

Na medicina veterinária, a clindamicina é amplamente utilizada para tratamentos de uma ampla variedade de infecções, Fiebelkorn et al. (2003) ainda citam sua utilização para infecções causadas por *Staphylococcus*, principalmente os MRSA. Na Coréia do Sul, Kim et al. (2004) investigaram a resistência ao grupo MLSb em *Staphylococcus aureus*, constatando que 97% dos MRSA apresentaram

resistência a pelo menos uma das drogas desse grupo, porém todos os isolados estudados foram sensíveis à quinupristin/dalfopristin. Dados semelhantes foram encontrados por Bordin et al. (2014), onde 94% dos MRS encontrados no hospital veterinário foram resistentes a pelo menos uma das drogas testadas (eritromicina e clindamicina)

Epidemiologicamente, a resistência cruzada entre essas três classes de antimicrobianos é muito importante (DIPERSIO; DIPERSIO, 2005), uma vez que os macrolídeos e lincosaminas são amplamente utilizados na medicina veterinária, levando ao aumento de resistência em estirpes bacterianas de origem animal (WANG et al, 2008; JAGLIC et al, 2012). Nawaz et al. (2000) e De Leener et al. (2004) relatam a possível transmissão de genes de resistência dos animais para os seres humanos através da cadeia alimentar.

O teste de disco difusão convencional pode apresentar falsos resultados quando for detectada a resistência aos MLSb induzida, mostrando, *in vitro*, resistência à eritromicina e uma falsa sensibilidade à clindamicina (FIEBELKORN et al., 2003; WEISBLUM, 2005). O CLSI (2008) desenvolveu um método fenotípico para detecção da resistência induzida, chamado de teste de difusão em disco duplo ou D-teste, onde discos de clindamicina (2µg) e eritromicina (15µg) são dispostos um ao lado do outro a uma distância de 15 – 25 mm. A resistência induzida à clindamicina é detectada pelo aparecimento de uma zona de inibição em forma de “D”.

Em MRSA isolados de seres humanos e animais, a resistência à clindamicina induzida é bem documentada e já se tem alguns relatos desse tipo de resistência em amostras MRSP (RUBIN et al., 2011; PERRETEN et al., 2010; FAIRES et al., 2009; RICH et al., 2005). Sabe-se que a pressão antimicrobiana acarreta na seleção de bactérias resistentes ao grupo MLSb, porém a transferência horizontal de genes de resistência também está bem elucidada (MARTEL et al, 2003;. PATTERSON et al., 2007).

#### **4.6. *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE)**

Os enterococos foram descritos pela primeira vez em 1899, e até o ano de 1984 pertencia ao gênero *Streptococcus* (SCHLEIFER; KILPPER, 1984; THIERCELIN, 1899) atualmente são descritas 40 espécies diferentes, sendo que as

mais comumente encontradas em seres humanos são *E. faecalis* e *E. faecium*, enquanto que nos animais, além dessas duas espécies também se destaca a *E. cecorum* e *E. hirae* (DEVRIESE et al., 1991; KLEIN, 2003). Os enterococos são colonizadores do trato gastrointestinal tanto de humanos como dos animais (SHEPARD; GILMORE, 2002) e conseguem sobreviver por meses no ambiente, mesmo quando em condições adversas (KRAMER et al., 2009).

Atualmente, os *Enterococcus* são considerados como importantes patógenos oportunistas, principalmente em infecções hospitalares, geralmente associados a infecções de ferida, do trato urinário e endocardites (FISHER; PHILLIPS, 2009), sendo considerados o terceiro patógeno nosocomial mais prevalente em todo o mundo (ECDC, 2011). São intrinsecamente resistentes a antimicrobianos comumente utilizados, incluindo cefalosporinas e alguns aminoglicosídeos (SHEPARD; GILMORE, 2002), além de adquirir resistência à penicilina/ampicilina, aminoglicosídeos de alto nível e aos glicopeptídeos, limitando a prática terapêutica (SOOD et al., 2008).

A vancomicina é um antimicrobiano importante no tratamento de infecções enterocócicas, porém a eficiência desse antibiótico foi limitada pelo aparecimento de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE), principalmente em cepas com a presença do gene *vanA*, tornando-se assim, uma das bactérias mais importantes clinicamente resistente aos antimicrobianos em todo o mundo (EISNER et al., 2005; FUJITA et al., 1998). Poucos são os agentes terapêuticos capazes de tratar infecções enterocócicas, dentre eles a quinupristina/dalfopristina, linezolida, a tigeciclina e a daptomicina, sendo no entanto, apenas utilizadas em determinadas ocasiões e mesmo assim, resistência a essas drogas já foram descritas (ARIAS et al., 2011; WERNER et al., 2002, 2008).

O gene *vanA* que confere resistência à vancomicina, foi detectado pela primeira vez na Europa no ano de 1986 em estirpes de *E. faecium* e *E. faecalis* (LECLERCQ et al., 1988; UTTLEY et al., 1989). Posteriormente também foi detectado em estirpes de *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. avium* e *E. mundtii* (WERNER et al., 2008) e em amostras de aves, na espécie *E. cecorum* (HARADA et al., 2012). Até o momento, foram descritas nove variantes diferentes de resistência à vancomicina em enterococos, consistindo nos genes *vanA*, B, C, D, E, G, L, M e N (LEBRETON et al., 2011; XU et al., 2010; BOYD, 2008; COURVALIN, 2006), sendo que os tipos *vanA*, B e C são os mais



comuns (FISHER; PHILLIPS, 2009; WERNER et al., 2008b). Uma variante adicional (*vanF*) com alta semelhança na sequência de aminoácidos para o *vanA* foi descrita, mas apenas em *Paenibacillus popilliae*, sendo sugerida como uma possível origem de resistência à vancomicina em enterococos (PATEL, 2000).

Em 1975, a avoparcina, um análogo da vancomicina, começou a ser utilizada na Europa, Ásia e Oceania, como um promotor de crescimento e como agente profilático na alimentação de animais de criação (JUNG et al., 2007; KLARE et al., 1999), principalmente em frangos e suínos, sendo também utilizada em menor escala em perus, vitelos e outros animais (HAMMERUM et al., 2010). Nos EUA e no Canadá, a avoparcina nunca foi aprovada para utilização em animais (MCDONALD et al., 1997). O uso da avoparcina foi de tal tamanho, que em 1994, na Dinamarca, foi utilizado 24kg de vancomicina na medicina humana, enquanto que mais de 24.000kg de avoparcina foram utilizados em animais (WEGENER, 1998). Dados semelhantes aos que ocorreram na Austrália, onde menos de 600kg de vancomicina foram utilizados e mais de 62.000kg de avoparcina foram importados (WHITTE, 1998).

Com isso, o uso de avoparcina começou a ser associando com a presença de *Enterococcus* vancomicina resistente em animais de criação, uma vez que a avoparcina confere resistência cruzada à vancomicina (CHAN et al., 2008; BORGEN et al., 2000; BAGER et al., 1997). *E. faecium* portadores do gene *vanA* passaram a ser comuns na flora intestinal de animais de criação em toda a Europa na década de 1990 (KLARE et al., 1995). Fato esse que não ocorreu nos EUA e Canadá, devido à proibição da avoparcina. A primeira amostra de VRE em animais de produção nos EUA só foi isolada em 2008 (DONABEDIAN et al., 2010), apontando para outros meios de seleção, introdução e propagação de VRE *vanA* neste local (GORDONCILLO et al., 2013).

Quando estabelecida a conexão entre avoparcina e VRE, o uso desse antimicrobiano começou a ser proibido, em 1995 na Dinamarca e em 1997 na Alemanha e toda a Europa, com a instituição da Diretiva 97/6/CE (AARESTRUP et al., 2000; KIRST et al., 1998; ANONYMOUS, 1997). Mesmo com a proibição do uso da avoparcina e consequente diminuição da pressão seletiva exercida por esse promotor de crescimento, cepas de enterococos resistentes continuaram a ser isoladas (JOHNSEN et al., 2009), fato esse corroborado pelo estudo de Harada et al.

(2010), onde foram isoladas cepas VRE tipo *vanA* em oito de 171 (4,7%) amostras de aves no Japão, mesmo após mais de 11 anos a proibição da avoparcina.

Apesar de escassas, já existem evidências de VRE com origem animal causando infecções em humanos (LARSEN et al., 2010, 2011), fato esse comprovado por Gelsomino et al. (2003) que isolaram estirpes idênticas, uma de *E. faecalis* e outra de *E. casseliflavus*, em leite, queijo e amostras de fezes humanas, sugerindo uma via de transmissão entre estas fontes. Freitas et al. (2011) comprovaram a relação entre clones hospitalares e VRE associados a suínos.

Quando enterococos derivados de animais colonizam a flora intestinal de humanos por um curto período, sem causar nenhuma alteração, pode ser suficiente para a transmissão de genes de resistência para cepas mais adaptadas (LESTER et al., 2006), podendo também se espalhar entre humanos, mostrando assim um grande potencial zoonótico de certos genes de resistência, como o caso do gene *vanA* de VRE, onde os animais de criação podem ser considerados um reservatório para a resistência (WHITTE, 2000).

O gene *vanA* é muitas vezes transferido por um transposon, um elemento genético que pode ser incorporado tanto no plasmídeo bacteriano como no DNA cromossomal sendo o principal transposon envolvido o Tn1546 (COURVALIN, 2006). Esta transferência pode ocorrer de uma bactéria de origem animal para uma de origem humana, como descrito por Jensen (1988), quando mostrou variantes específicas do Tn1546 em frangos e suínos e também em seres humanos saudáveis.

Nos EUA, um relatório de 2006-2007 realizado pela Rede Nacional de Segurança da Saúde do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), mostrou que o *Enterococcus* é o segundo patógeno mais encontrado nos hospitais norte americanos (HIDRON et al., 2008) devido ao uso generalizado e sem controle de vancomicina e cefalosporinas de espectro estendido ao longo dos últimos 20 anos (KIRST et al., 1998). No Brasil, o primeiro isolado humano ocorreu em Curitiba, em 1996, quando uma amostra VRE *vanD* foi identificada e, um ano depois, houve o relato do primeiro VRE *vanA* em São Paulo (ZANELLA, 2003; DALLA et al., 1998). Mais tarde foram detectadas estirpes em hospitais de varias cidades do país, tais como, Marília, Campinas, Rio de Janeiro, Uberlândia, Porto Alegre e outros (PALAZZO et al., 2011; CAMARGO et al., 2006; D'AZEVEDO et al., 2000).

A transmissão do gene de resistência a vancomicina de amostras de animais para os seres humanos já está bastante elucidada, assim como o fato da facilidade dos micro-organismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* em adquirir resistência e disseminá-la entre as bactérias do mesmo gênero e até mesmo para outros tipos bacterianos (como no caso do gene *vanA* encontrado em cepas MRSA), sendo assim, o seu monitoramento deve ser constante a ponto de evitar infecções hospitalares e o seu risco para a saúde pública.

#### 4.7. Referências

AARESTRUP, F. M.; KRUSE, H.; TAST, E.; HAMMERUM, A. M.; JENSEN, L. B. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland, and Norway. **Microb Drug Resist** (Larchmont, NY), v.6, p.63-70, 2000.

ÁLVAREZ-LERMA, F.; PALOMAR, M.; OLAECHEA, P.; OTAL, J. J.; INSAUSTI, J.; CERDA, E. Evolutive report of the years 2003-2005. **Med Intensiva**, v. 31, p. 6-17, 2007.

Anonymous. Commission directive 97/6/EC. Off J Eur Commun 1997; L35 5.2.97:11-3.

ARIAS, C. A.; PANESSO, D.; MCGRATH, D. M.; QIN, X.; MOJICA, M. F.; MILLER, C.; DIAZ, L.; TRAN, T. T.; RINCON, S.; BARBU, E. M.; REYES, J.; ROH, J. H.; LOBOS, E.; SODERGREN, E.; PASQUALINI, R.; ARAP, W.; QUINN, J. P.; SHAMOO, Y.; MURRAY, B. E.; WEINSTOCK, G. M. Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci. **N. Engl. J. Med.**, v.365, p.892–900, 2011.

BAGER, F.; MADSEN, M.; CHRISTENSEN, J.; AARESTRUP, F. M. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. **Prev Vet Med.**, v.31, p.95-112, 1997.

BLACK, C.C.; SOLYMAN, S.M.; EBERLEIN, L.C.; BEMIS, D.A.; WORON, A.M.; KANIA, S.A. Identification of a predominant multilocus sequence type, pulsed-field gel electrophoresis cluster, and novel staphylococcal chromosomal cassette in clinical isolates of *mecA*-containing, methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* **Vet. Microbiol.**, v.139, p.333-338, 2009.

BLOUIN, D. D. All in the family? Understanding the meaning of dogs and cats in the lives of american pet owners. PhD thesis. Department of Sociology, Bloomington, Indiana University, 2008.

BOND, R. e LOEFFLER, A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. **J. Small Anim Pract.**, v.53, p.147-154, 2012.

BORDIN, J.T.; SFACIOTTE, R.A.P.; CORONEL, L.G.; MENDES, L.M.; VIGNOTO, V.K.C.; DE CONTI, J.B.; WOSIACKI, S.R. Identificação de cepas bacterianas multirresistentes isoladas de feridas de pequenos animais do Hospital Veterinário da UEM. **Pesquisa Brasileira Veterinária** IN PRESS, 2014.

BORGEN, K.; SIMONSEN, G. S.; SUNDSFJORD, A.; WASTESON, Y.; OLSVIK, Ø.; KRUSE, H. Continuing high prevalence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned. **Journal of Applied Microbiology.**, v.89, p.478–485, 2000.

BOYD, D. A.; WILLEY, B. M.; FAWCETT, D.; GILLANI, N.; MULVEY, M. R. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.52, p.2667-72, 2008.

BOYLE-VAVRA, S. e DAUM, R. S. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Pantón-Valentine leukocidin. **Lab. Invest.** v.87, p.3-9, 2007.

CAMARGO, I. L. B. C.; GILMORE, M. S.; DARINI, A. L. C. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. **Clin Microbiol Infect.**, v.12, p.1123–1130, 2006

CARTWRIGHT, E. J. P.; PATERSON, G. K.; RAVEN, K. E.; HARRISON, E. M.; GOULIOURIS, T.; KEARNS, A.; PICHON, B.; EDWARDS, G.; SKOV, R. L.; LARSEN, A. R.; HOLMES, M. A.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J.; TOROK, M. E. Use of Vitek 2 antimicrobial susceptibility profile to identify mecC in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.51, p.2732–2734, 2013.

CASTELLANO-GONZALEZ, M. J.; PEROZO-MENA, A. J.; VIVAS-VEJA, R. L.; GINESTRE-PEREZ, M. M.; RINCON-VILLALOBOS, G. C. Molecular and phenotypical typification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in a university hospital. **Rev. Chilena. Infectol.**, v.26, p.39-48, 2009.

Centers of Disease Control and Prevention. Outbreaks of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections – Los Angeles County, California, 2002-3. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**52:88, 2003.

CHAN, Y. Y.; NASIR, M. H. B. A.; YAHAYA, M. A. B.; SALLEH, N. M. A. B.; DAN, A. D. B. M.; MUSA, A. M. B.; RAVICHANDRAN, M. Low prevalence of vancomycin- and bifunctional aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry farms in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology.**, v.122, p.221–226, 2008.

CHANG, S.; SIEVERT, D. M.; HAGEMAN, J. C.; BOULTON, M. L.; TENOVER, F. C.; DOWNES, F. P.; SHAH, S.; RUDRIK, J. T.; PUPP, J. R.; BROWN, W. J.; CARDO, D.; FRIDKIN, S. K. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. **N. Engl. J. Med.**, v.348, p.1342-1347, 2003.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard – Third Edition. M31-A3. v.28, n.8, 2008.

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clin Infect Dis.**, v.42, p.S25-34, 2006.

CUI, L.; MA, X.; SATO, K.; OKUMA, K.; TENOVER, F. C.; MAMIZUKA, E. M.; GEMMELL, C. G.; KIM, M. N.; PLOY, M. C.; ELSOLH, N.; FERRAZ, V.; HIRAMATSU, K. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.** v.41, p.5–14, 2003.

CUI, L.; MURAKAMI, H.; KUWAHARA-ARAI, K.; HANAKI, H.; HIRAMATSU, K. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.44, p.2276–285, 2000.

CUNY, C.; LAYER, F.; STROMMINGER, B.; WITTE, W. Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel mecA homologue in humans in Germany. **PLoS ONE.**, v.6, e24360, 2011.

DALLA COSTA, L. M.; SOUZA, D. C.; MARTINS, L. T.; ZANELLA, R. C.; BRANDILONE, M. C.; BOKERMANN, S.; SADER, H. S.; SOUZA, H. A. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: First Case in Brazil. **Braz J Infect Dis.**, v.2, n.3, p.160-163, 1998.

D'AZEVEDO, P. A.; KACMAN, S.B.; SCHMALFUSS, T.; SILVA, A.; RODRIGUES, L.F. Primeiro caso de *Enterococcus* resistente a vancomicina isolado em Porto Alegre, RS. **J Bras Pat.**, v.36, p.258, 2000.

DE LEENER, E.; MARTEL, A.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. Distribution of the *erm(B)* gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. **Microb. Drug Resist.**, v.10, p.341–345, 2004.

DE LUCIA, M.; MOODLEY, A.; LATRONICO, F.; GIORDANO, A.; CALDIN, M.; FONDATI, A.; GUARDABASSI, L. Prevalence of canine methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary diagnostic laboratory in Italy. **Research in Veterinary Science.**, v.91, p.346-348, 2011.

DESCLOUX, S.; ROSSANO, A.; PERRETEN, V. Characterization of new staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* **J. Clin. Microbiol.**, v.46, p.1818–1823, 2008.

DEURENBERG R. H. e STABBERINGH E.E. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Curr. Molec. Med.**, v.9, p.100-115, 2009.

DEVRIESE, L. A.; HOMMEZ, J.; WIJFELS, R.; HAESEBROUCK, F. Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. **J Appl Bacteriol.**, v.71, p46-50, 1991.

DEVRIESE, L. A.; VAN DAMME, L. R.; FAMEREE, L. Methicillin-(cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. **Zentralbl. Veterinarmed. B.**, v.19, p. 598–605, 1972.

DEVRIESE, L. A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.55, p.1569-1573, 2005.

DIPERSIO, J. R.; DIPERSIO, L. P. Update on the prevalence and spread of macrolide and lincosamide-resistant staphylococcal and streptococcal species. **Rev. Med. Microbiol.**, v.16, p.117–123, 2005.

DONABEDIAN, S. M.; PERRI, M. B.; ABDUJAMILOVA, N.; GORDONCILLO, M. J.; NAQVI, A.; REYES, K. C.; ZERVOS, M. J.; BARLETT, P. Characterization of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* isolated from swine in three Michigan counties. **J Clin Microbiol.**, v.48, p.4156-60, 2010.

ECDC. Annual Epidemiological Report 2011, Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe, Stockholm, SE, 2011

EISNER, A.; FEIERL, G.; GORKIEWICZ, G.; DIEBER, F.; KESSLER, H. H.; MARTH, E.; KÖFER, J. High prevalence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci in Austrian poultry. **Applied and Environmental Microbiology.**, v.71, p.6407–6409, 2005.

ENRIGHT, M. C. The evolution of a resistant pathogen--the case of MRSA. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v.3, p.474-479, 2003.

FAIRES, M.; GARD, S.; AUCOIN, D.; WEESE, J. S. Inducible clindamycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs and cats [letter to the editor]. **Vet Microbiol.**, v.139, p.419–20, 2009.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development-the failure of success? **Nat. Biotechnol.**, v.24, p.1497-503, 2006.

FERREIRA, R. B. R.; LORIO, N. L. P.; MALVAR, K. L.; NUNES, A. P. F.; FONSECA, L. S.; BASTOS, C. C. R.; SANTOS, K. R. N. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the Agar screen test by using different concentrations of oxacillin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.8, p.3609-3614, 2003.

FIEBELKORN, K. R.; CRAWFORD, S. A.; MCELMEEL, M. L.; JORGENSEN, J. H. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4740-4744, 2003.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155(Pt 6) p.1749-57, 2009.

FLUIT, A. C.; WIELDEERS, C. L.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, F. J. Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3727-3732, 2001.

FREITAS, A. R.; COQUE, T. M.; NOVAIS, C.; HAMMERUM, A. M.; LESTER, C. H.; ZERVOS, M. J.; DON-ABEDIAN, S.; JENSEN, L. B.; FRANCA, M. V.; BAQUERO, F.; PEIXE, L. Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. **J. Clin. Microbiol.**, v.49, p.925–931, 2011.

FUJITA, N.; YOSHIMURA, M.; KOMORI, T.; TANIMOTO, K.; IKE, Y. First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, p.2150, 1998.

GARCIA ALVAREZ, L.; WEBB, C. R.; HOLMES, M. A. A novel field-based approach to validate the use of network models for disease spread between dairy herds. **Epidemiol. Infect.**, v.139, p.1863–1874, 2011a.

GARCIA-ALVAREZ, L.; HOLDEN, M. T. G.; LINDSAY, H.; WEBB, C. R.; BROWN, D. F. J.; CURRAN, M. D.; WALPOLE, E.; BROOKS, K.; PICKARD, D. J.; TEALE, C.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S.; EDWARDAS, G. F.; GIRVAN, E. K.; KEARNS, E. M.; PICHON, B.; HILL, R. L. R.; LARSEN, A. R.; SKOV, R. L.; PEACOCK, S. J.; MASKELL, D. J.; HOLMES, M. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **Lancet Infect. Dis.**, v.11, p.595–603, 2011b.

GARDETE, S.; KIM, C.; HARTMANN, B. M.; MWANGI, M.; ROUX, C. M.; DUNMAN, P. M.; CHAMBERS, H. F.; TOMASZ, A. Genetic pathway in acquisition and loss of vancomycin resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain of clonal type USA300. **PLoS Pathog.**, v.8, e1002505, 2012.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; COGAN, T. M.; SWINGS, J. Effect of raw-milkcheese consumption on the enterococcal flora of human feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.312–319, 2003.

GORDONCILLO, M. J.; DONABEDIAN, S.; BARTLETT, P. C.; PERRI, M.; ZERVOS, M.; KIRKWOOD, R.; FEBVAY, C. Isolation and Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* from Swine in Michigan, USA. **Zoonoses Public Health**, v.60, n.5, p.319-326, 2013

GRIFFETH, G. C.; MORRIS, D. O.; ABRAHAM, J. L.; SHOFER, F. S.; RANKIN, S. C. - Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. **Vet. Dermatol.**, v.19, p.142-149, 2008.

HAENNI, M.; TARGANT, H.; FOREST, K.; SÉVIN, C.; TAPPREST, J.; LAUGIER, C.; MADEC, J. Y. Retrospective study of necropsy-associated coagulase-positive staphylococci in horses. **Journal of Veterinary diagnostic Investigation**, v.22, p.953-956, 2010.

HAMMERUM, A. M.; LESTER, C. H.; HEUER, O. E. Antimicrobial resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? **Foodborne Pathogens Dis.**, v.7, p.1137-46, 2010.

HARADA, T.; KANKI, M.; KAWAI, T.; TAGUCHI, M.; ASAO, T.; KUMEDA, Y. Isolation of VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus* strains from domestic poultry products with enrichment by incubation in buffered peptone water at 42 °C. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.5317–5320, 2010.

HARADA, T.; KAWAHARA, R.; KANKI, M.; TAGUCHI, M.; KUMEDA, Y. Isolation and characterization of *vanA* genotype vancomycin-resistant *Enterococcus cecorum* from retail poultry in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, n.3, p.372-377, 2012.

HARRISON, E.M. et al. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. **EMBO Mol. Med.**, v.5, p.509–515, 2013

HIDRON, A. I.; EDWARDS, J. R.; PATEL, J.; HORAN, T. C.; SIEVERT, D. M.; POLLOCK, D. A.; FRIDKIN, S. K. for the National Healthcare Safety Network Team and Participating National Healthcare Safety Network Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v.9, p.996–1011, 2008.

HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **Lancet Infect Dis**, v.1, p.147–155, 2001

HIRAMATSU, K., et al. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.292, p.67-74, 2002.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUSHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet.**, v.350, p.1668–71, 1997a.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J Antimicrob Chemother.**, v.40, p.135–36, 1997b.

HISATA K., KUWAHARA-ARAI K., YAMANO M., ITO T., NAKATOMI Y., CUI L., BABA T., TERASAWA M., SOTOZONO C., KINOSHITA S., YAMASHIRO Y. e HIRAMATSU K. 2005. Dissemination of methicillin resistant staphylococci among healthy japanese children. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.3364-3372, 2005..

HOWDEN, B. P.; DAVIES, J. K.; JOHNSON, P. D.; STINEAR, T. P.; GRAYSON, M. L. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. **Clin Microbiol Rev.**, v.26, p.99–139, 2010.



International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.53, p.4961–4967, 2009.

ITO, T. ET AL. Guidelines for reporting novel mecA gene homologues. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.56, p.4997–4999, 2012.

JAGLIC, Z; VLKOVA, H.; BARDON, J.; MICHU, E.; CERVINKOVA, D.; BABAK, V. Distribution, characterization and genetic bases of erythromycin resistance in staphylococci and enterococci originating from livestock. **Zoonoses Public Health.**, v.59, p.202–211, 2012.

JENSEN, L. B. Differences in the occurrence of two base pair variants of Tn1546 from vancomycin-resistant enterococci from humans, pigs, and poultry. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.42, p.2463-4, 1998.

JOHNSEN, P. J.; TOWNSEND, J. P.; BOHN, T.; SIMONSEN, G. S.; SUNDSFJORD, A.; NIELSEN, K. M. Factors affecting the reversal of antimicrobial-drug resistance. **Lancet Infect. Dis.**, v.9, p.357–364, 2009.

JUNG, W. K.; LIM, J. Y.; KWON, N. H.; KIM, J. M.; HONG, S. K.; KOO, H. C.; KIM, S. H.; PARK, Y. H. Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.102–107, 2007.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M.; DORMAN, N. J.; LERNER, S. A. Emergence of teicoplanin resistance during therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. **J. Infect. Dis.**, v.162, p.103–108, 1990.

KAWAKAMI, T.; SHIBATA, S.; MURAYAMA, N.; NAGATA, M.; NISHIFUJI, K.; IWASAKI, T.; FUKATA, T. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. coagulans isolated from dogs with pyoderma in Japan. **Journal of Veterinary Medicine Science** v.72, n.12, p.1615-9, 2010.

KIM, C.; MILHEIRIÇO, C.; GARDETE, S.; HOLMES, M. A.; HOLDEN, M. T. G.; LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the betalactam-resistant phenotype. **J. Biol. Chem.**, v.287, p.36854–36863, 2012.

KIM, H. B.; LEE, B.; JANG, H. C.; KIM, S. H.; KANG, C. I.; CHOI, Y. J.; PARK, S. W.; KIM, B. S.; KIM, E. C.; OH, M. D.; CHOE, K. W. A high frequency of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance determinants in *Staphylococcus aureus* isolated in South Korea. **Microb Drug Resist.** v.10, n.3, p.248-54, 2004.

KIRST, H. A.; THOMPSON, D. G.; NICAS, T. I. Historical yearly usage of vancomycin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, n.42, p.1303-4, 1998.

KLARE, I.; BADSTÜBNER, D.; KONSTABEL, C.; BÖHME, G.; CLAUS, H.; WITTE, W. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after

discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. **Microbial Drug Resistance**, n.5, p.45–52, 1999

KLARE, I.; HEIER, H.; CLAUS, H.; REISSBRODT, R.; WITTE, W. vanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. **FEMS Microbiol let.**, v.125, p.165-71, 1995.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **Int J Food Microbiol.**, n.88, p.123 – 31, 2003.

KLUYTMANS, J.A.J. e VANDEN BERGH, M.F.Q. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: Current perspectives. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.12, n.1, p.9-15, 2006.

KONDO Y., ITO T., MA X.X., WATANABE S., KREISWIRTH B.N., ETIENNE J. e HIRAMATSU K. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.51, p.264-274, 2007.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infect Dis.**, v.6, p.130, 2006.

LARSEN, J.; SCHONHEYDER, H. C.; LESTER, C. H.; OLSEN, S. S.; PORSBO, L. J.; GARCIA-MIGURA, L.; JENSEN, L. B.; BISGAARD, M.; HAMMERUM, A. M. Porcine-origin gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* in Humans, Denmark. **Emerg. Infect. Dis.**, v.16, p.682–684, 2010.

LARSEN, J.; SCHONHEYDER, H. C.; SINGH, K. V.; LESTER, C. H.; OLSEN, S. S.; PORSBO, L. J.; GARCIA-MIGURA, L.; JENSEN, L. B.; BISGAARD, M.; MURRAY, B. E.; HAMMERUM, A. M. Porcine and human community reservoirs of *Enterococcus faecalis*, Denmark. **Emerg. Infect. Dis.**, v.17, p.2395–2397, 2011.

LEBRETON, F.; DEPARDIEU, F.; BOURDON, N.; FINES-GUYON, M.; BERGER, P.; CAMIADE, S.; LECLERCQ, R.; COURVALIN, P.; CATTOIR, V. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55: p.4606-12, 2011.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance of macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clin Infect Dis.**, v.34, n.4, p.482-92, 2002.

LECLERCQ, R.; DERLOT, E.; DUVAL, J.; COURVALIN, P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **The New England Journal of Medicine**, v.319, p.157–161, 1988.

LESTER, C. H.; FRIMODT-MOLLER, N.; SORENSEN, T. L.; MONNET, D. L.; HAMMERUM, A. M. In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. **Antimicrob Agents chemother**, v.50, p.596-9, 2006.

LOEZA-LARA, P. D.; SOTO-HUIPE, M.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; VALDEZ-ALARCON, J. J.; CANO-CAMACHO, H.; LOPEZ-MEZA, J. E. pBMSa1, a plasmid from a dairy cow isolate of *Staphylococcus aureus*, encodes a lincomycin resistance determinant and replicates by the rolling-circle mechanism. **Plasmid**, v.52, p.48–56, 2004.

LOPES, H. V. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.7, n.3, p.34-36, 2009.

LOWY F.D. Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.**, v.111, p.1265-1273, 2003.

LÜTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide–lincosamide resistance phenotypes and genotypes. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.57, p.966–969, 2006.

MA X.X., ITO T., TIENSASITORN C., JAMKLANG M., CHONGTRAKOOL P., BOYLE-VAVRA S., DAUM R.S. e HIRAMATSU K. 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, n.4, p.1147-1152, 2002.

MANQUAT, G.; CROIZE, J.; STAHL, J. P.; MEYRAN, M.; HIRTZ, P.; MICOUD, M. Failure of teicoplanin treatment associated with an increase in MIC during therapy of *Staphylococcus aureus* septicemia. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.29, p.731–732, 1992.

MARTEL, A.; MEULENAERE, V.; DEVRIESE, L. A.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. Macrolide and lincosamide resistance in the gram-positive nasal and tonsillar flora of pigs. **Microb. Drug Resist.**, v.9, p.293–297, 2003.

MCDONALD, L. C.; KUEHNERT, M. J.; TENOVER, F. C.; JARVIS, W. R. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. **Emerg Infect Dis.**, v.3, p.311-7, 1997.

McDOUGAL, L. K.; STEWARD, C. D.; KILGORE, G. E.; CHAITRAM, J. M.; McALLISTER, S. K.; TENOVER, F. C. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.5113-5120, 2003.

MEDHUS, A.; SLETTEMEAS, J. S.; MARSTEIN, L.; LARSEN, K. W.; SUNDE, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the novel *mecC* gene variant isolated from a cat suffering from chronic conjunctivitis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.68, p.968–969, 2013.

MELO-CRISTINO, J.; RESINA, C.; MANUEL, V.; LITO, L.; RAMIREZ, M. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **The Lancet**, v.382, p.205, 2013.

MONACO, M.; PEDRONI, P.; SANCHINI, A.; BONOMINI, A.; INDELICATO, A.; PANTOSTI, A. Livestock associated MRSA responsible for human colonization and infection in an area of Italy with high density of pig farming. **BMC Infect. Dis.**, v. 13, 258, 2013.

MONCHIQUE, C. R. O. Evolução da resistência aos antibióticos em *Staphylococcus* spp. –1999 a 2006. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Dissertação de Mestrado, 2013.

MORAN, G. J.; KRISHNADASAN, A.; GORWITZ, R. J.; FOSHEIM, G. E.; MCDOUGAL, L. K.; CAREY, R. B. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. **N Engl J Med.**, v.355, p.666-74, 2006.

MORRIS, D. O.; BOSTON, K. R.; SHEA, C. O.; RANKIN, S. C. The prevalence of carriage of methicillin-resistant Staphylococci by veterinary dermatology practice staff and their respective pets. **Vet. Dermatol.**, v.21, p.400–407, 2010.

MOYAERT, H.; DE GRAEF, E. M.; HAESBROUCK, F.; DECOSTERE, A. Acquired antimicrobial resistance in the intestinal microbiota of diverse cat populations. **Research in Veterinary Science, London**, v.81, n.1, p.1-7, 2006.

MUÑOZ BELLIDO, J. L. Problematic bacteria. **Rev Esp Quimioter**, v. 21, n. 1, p. 2-6, 2008.

NAWAZ, M. S.; KHAN, S. A.; KHAN, A. A.; KHAMBATY, F. M.; CERNIGLIA, C. E. Comparative molecular analysis of erythromycin-resistance determinants in staphylococcal isolates of poultry and human origin. **Mol. Cell Probes.**, v.14, p.311–319, 2000.

OLIVEIRA D.C., MILHEIRICO C. e DE LENCASTRE H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50, p.3457-3459, 2006.

OLIVEIRA, A.C. SILVA, R.S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**. v.10, n.1, p.189-197, 2008.

OLIVEIRA, D. C., DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Chemother**, v.46, p.2155-2161, 2002.

PALAZZO, I. C. V.; PITONDO-SILVA, A.; LEVY, C. E.; DARINI, A. L. C. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. **J Hosp Infect.**, v.79, n.1, p.70-4, 2011.

PATEL, R.; PIPER, K.; COCKERILL, F. R III.; STECKELBERG, J. M.; YOUSTEN, A. A. The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal *vanA* vancomycin resistance gene cluster. **Antimicrob Agents Chemother**, v.44: p.7059, 2000.

PATHERSON, G. K.; LARSEN, A. R.; ROBB, A.; EDWARDS, G. E.; PENNYCOTT, T. W.; FOSTER, G.; MOT, D.; HERMANS, K.; BAERT, K.; PEACOCK, S. J.;

PARKHILL, J.; ZADOKS, R. N.; HOLMES, M. A. The newly described *mecA* homologue, *mecA*(LGA251), is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.67, p.2809–2813, 2012.

PATTERSON, A. J.; COLANGELI, R.; SPIGAGLIA, P.; SCOTT, K. P. Distribution of specific tetracycline and erythromycin resistance genes in environmental amples assessed by macroarray detection. **Environ. Microbiol.**, v.9, p.703–715, 2007.

PERRETEN, V.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; GRÖNLUND ANDERSSON, U.; FINN, M.; GREKO, C.; MOODLEY, A.; KANIA, S. A.; FRANK, L. A.; BEMIS, D. A.; FRANCO, A.; IURESCIA, M.; BATTISTI, A.; DUIM, B.; WAGENAAR, J. A.; VAN DUIJKEREN, E.; WEESE, J. S.; FITZGERALD, J. R.; ROSSANO, A.; GUARDABASSI, L. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicenter study. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.65, p.1145–1154, 2010.

PILLAI, S. K.; WENNERSTEN, C.; VENKATARAMAN, L.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C.; KARCHMER, A. W. Development of reduced vancomycin susceptibility in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. **Clin. Infect. Dis.**, v.49, p.1169–1174, 2009.

RANTALA, M.; LAHTI, E.; KUHALAMPI, J.; PESONEN, S.; JARVINEN, A. K.; SAIJONMAA-KOULUMIES, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in dogs given antibiotics for chronic dermatological disorders, compared with non-treated control dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v.45, n.1-2, p.37-45, 2004.

REIPERT, A.; EHLERT, K.; KAST, T.; BIERBAUM, G. Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.47, p.568–576, 2003.

REISCHL, U.; FRICK, J.; HOERMANSDORFER, S.; MELZL, H.; BOLLWEIN, M.; LINDE, H.J.; BECKER, K.; KÖCK, R.; TUSCHAK, C.; BUSCH, U.; SING, A. Single-nucleotide polymorphism in the SCCmec-orfX junction distinguishes between livestock-associated MRSA CC 398 and human epidemic MRSA strains. **Euro Surveill.**, v. 14, n. 49, p.19436, 2009.

RIBEIRO, A.; CORONADO, A. Z.; SILVA-CARVALHO, M. C.; FERREIRA-CARVALHO, B. T.; DIAS, C.; ROZENBAUM, R.; DEL PELOSO, P. F.; LEITE, C. C. F.; TEIXEIRA, L. A.; FIGUEIREDO, A. M. S. Detection and characterization of international community-acquired infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Rio de Janeiro and Porto Alegre cities causing both community-and hospital-associated diseases. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v.59, p.339-45, 2007.

RIBEIRO, A.; DIAS, C.; SILVA-CARVALHO, M. C.; BERQUÓ, L.; FERREIRA, F. A.; SANTOS, R. N. S.; FERREIRA-CARVALHO, B. T.; FIGUEIREDO, A. M. First report of infection with Community- Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in South America. **Journal of Clinical Microbiology.**, v.43, n.4, p.1985- 1988, 2005.

RICH, M.; DEIGHTON, L.; ROBERTS, L. Clindamycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. **Vet Microbiol.**, v.111, p.237–40, 2005.

ROBERT, J.; BISMUTH, R.; JARLIER, V. Decreased susceptibility to glycopeptides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 20 year study in a large French teaching hospital, 1983–2002. **J. Antimicrob. Chemother**, V.57, p.506–510, 2006.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu; 2005

RUBIN, J. E.; BALL, K. R.; CHIRINO-TREJO, M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. **Can Vet J.**, v.52, p.153–7, 2011.

RUSCHER, C.; LUBKE-BECKER, A.; WLEKLINSKI, C. G.; SOBA, A.; WIELER, L. H.; WALTHER, B. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. **Veterinary Microbiology**, v.136, p.197-201, 2009.

RYBAK, M. J.; CHA, R.; CHEUNG, C. M.; MEKA, V. G.; KAATZ, G. W. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from 1987 and 1989 demonstrating heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.51, p.119–125, 2005.

SABAT, A. J.; KOKSAL, M.; AKKERBOOM, V.; MONECKE, S.; KRIEGESKORTE, A.; HENDRIX, R.; EHRLICH, R.; KOCK, R.; BECKER, K.; FRIEDRICH, A. W.. Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains that carry a novel genetic homologue and important virulence determinants. **J. Clin. Microbiol.**, v.50, p.3374–3377, 2012.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K., TANAKA, Y., TAKAHASHI, N., KAMATA, S., HIRAMATSU, K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v.45: 2770-8, 2007.

SCHISLER, J. R.; HILLIER, A.; DANIELS, J. B.; COLE, L. K.; GEBREYES, W. A. Evaluation of Clinical Laboratory Standards Institute Interpretative Criteria for Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, p.684-688, 2009

SCHLEIFER, K. H.; KILPPER, B. R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom.rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **Int J Syst Bacteriol.**, v.34, p.31-4, 1984.

SHEA, K. Antibiotic Resistance: What is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health? **Pediatrics.**, v.112, p.253-258, 2003.

SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: The mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**, v.4, p.215–224, 2002.

SOOD, S.; MALHOTRA, M.; DAS, B. K.; KAPIL, A. Enterococcal infections and antimicrobial resistance. **Indian Journal of Medical Research**, v.128, p.111–121, 2008.

SOUSA, J. C. Manual de antibióticos antibacterianos (2ª edição). Porto: edições Universidade Fernando Pessoa, 2006.

STEWART, C. D.; RANEY, P. M.; MORRELL, A. K.; WILLIAMS, P. P.; McDOUGAL, L. K.; JEVITT, L.; Jr. McGOWAN, J. E.; TENOVER, F. C. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.4, p.1716-1721, 2005.

THIERCELIN, M. E. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. **C.R. Soc. Biol.**, v.51, p. 269–271, 1899.

UDO, E. E.; PEARMAN, J. W.; GRUBB, W. B. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. **J Hosp Infect.**, v.25, p.97-108, 1993.

UMBER, J. K., BENDER, J. B. Pets and antimicrobial resistance. **Veterinary Clinics North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.39, n.2, p.279-292, 2009.

UTTLEY, A. H. C.; GEORGE, R. C.; NAIDOO, J.; WOODFORD, N.; JOHNSON, A. P.; COLLINS, C. H.; MORRISON, D.; GILFILLAN, A. J.; FITCH, L. E.; HEPTONSTALL, J. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. **Epidemiology and Infection**, v.103, p.173–181, 1989.

VAN DUIJKEREN, E.; KAMPHUIS, M.; VAN der MIJE, I. C.; LAARHOVEN, L. M.; DUIM, B.; WAGENAAR, J. A.; HOUWERS, D. J. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. **Vet. Microbiol.**, v.150, p.338-343, 2011.

VAN HOOVELS, L.; VANKEERBERGHEN, A.; BOEL, A.; VAN VAERENBERGH, K.; BEENHOUWER, H. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.4609–4612, 2006.

VANDENESCH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M. C.; LINA, G.; NIMMO, G. R.; HEFFERNAN, H.; LIASSINE, N.; BES, M.; GREENLAND, T.; REVERDY, M. E.; ETIENNE, J. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying *Panton-Valentine Leukocidin* Genes: Worldwide Emergence. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.8, p.978- 984, 2003.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? Uso Racional de Medicamentos: **Temas Seleccionados**, v.1, n.4, p.1-6, 2004

WEESE, J. S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen in small animals. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.41, p.150-157, 2005

WEESE, J. S., VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Vet Microbiol**, v.140, p.418-429, 2010.

WEGENER, H. C. Historical yearly usage of glycopeptides for animals and humans: the American-European paradox revisited. **Antimicrob Agents Chemother**, v.42, p.3049, 1988.

WEISBLUM, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, p.577-585, 1995.

WELLER T.M.A. The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. **J. Antimicrob. Chemother**, v.43, p.15-22, 2000.

WENDLANDT, S., FEBLER, A.T., MONECKE, S., EHRLICH, R., SCHARWS, S. e KADLEC, K. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v.303, n.7, p.338-349, 2013

WERNER, G.; COQUE, T. M.; HAMMERUM, A. M.; HOPE, R.; HRYNIEWICZ, W.; JOHNSON, A.; KLARE, I.; KRISTINSSON, K. G.; LECLERCQ, R.; LESTER, C. H.; LILLIE, M.; NOVAIS, C.; PEIXE, L. V.; SADOWY, E.; SIMONSEN, G. S.; TOP, J.; WILLEMS, R. J.; WITTE, W.; WOODFORD, N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Euro Surveill**, v.13, n.47, 2008b.

WERNER, G.; GFRÖRER, S.; FLEIGE, C.; WITTE, W.; KLARE, I. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German ICU patient. **J. Antimicrob. Chemother**, v.61, p.1182–1183, 2008.

WERNER, G.; KLARE, I.; WITTE, W. Molecular analysis of streptogramin resistance in enterococci. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.292, p.81–94, 2002.

WHO (2009): WHO list of critically important antimicrobials for human medicine. Geneva: World Health Organisation.

WITTE W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science (New York, NY)**, v.279, p.996-7, 1998.

WITTE W. Selective pressure by antibiotic use in livestock. **Int J Antimicrob Agents**, v.16, p.S19-24, 2000.

XU, X.; LIN, D.; YAN, G.; YE, X.; WU, S.; GUO, Y.; ZHU, D.; HU, F.; ZHANG, Y.; WANG, F.; JACOBY, G. A.; WANG, M. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54: p.4643-7, 2010.

YAMAKAWA, J.; AMINAKA, M.; OKUZUMI, K.; KOBAYASHI, H.; KATAYAMA, Y.; KONDO, S.; NAKAMURA, A.; OGURI, T.; HORI, S.; CUI, L.; ITO, T.; JIN, J.; KUROSAWA, H.; KANEKO, K.; HIRAMATSU, K. Heterogeneously vancomycin-



intermediate *Staphylococcus* a retrospective study. **J. Infect. Chemother.** v.18, p.406–409, 2012.

ZANELLA, R. C.; BRANDILEONE, M. C. C.; BOKERMANN, S.; ALMEIDA, S. C. G.; VALDETARO, F.; VITÓRIO, F.; MOREIRA, M. F. A.; VILLINS, M.; SALOMÃO, R.; PIGNATARI, A. C. C. Phenotypic and Genotypic Characterization of *vanA* *Enterococcus* Isolated During the First Nosocomial Outbreak in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v.9, n.3, p.283-291, 2003.

ZHANG, Y.; AGIDI, S.; LEJEUNE, J.T. Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources. **J. Appl. Microbiol.**, v.107, p.1375–1383, 2009.

## 5. CAPÍTULO 2 - PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS BACTERIANOS DE INFECÇÕES CLÍNICAS CANINAS

### 5.1. RESUMO

A resistência antimicrobiana é descrita como uma condição ao qual um micro-organismo é capaz de sobreviver à exposição a um agente antimicrobiano. O objetivo deste estudo foi identificar os principais antimicrobianos resistentes em amostras clínicas de cães e detectar cepas multirresistentes de importância em saúde pública. Patógenos bacterianos de 77 infecções caninas foram isolados e determinado o perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Foi possível identificar 100 isolados bacterianos sendo 61 Gram positivos (55 *Staphylococcus* spp., quatro *Enterococcus* spp. e dois *Streptococcus* spp.) e 39 Gram negativos (36 fermentadores e três não fermentadores). 73 isolados foram considerados multirresistentes pela avaliação individual das drogas e 74 pela avaliação das classes. Apenas cinco se mostraram sensíveis a todas as drogas. Dois isolados foram resistentes a todas as classes, sendo isoladamente, sensíveis a alguns antimicrobianos. Das 55 amostras de *Staphylococcus* spp., 36 (65,45%) foram identificadas como MRS, fenotipicamente, 80,56% (29/36) indicaram a presença do gene *mecA*, 5,56% (2/36) do gene *mecC* e 13,89% (5/36) como hiperprodutoras de beta-lactamase. Dois isolados de *Enterococcus* spp. foram considerados resistentes a vancomicina (VRE). 61,54% (24/39) das amostras foram positivas no teste presumitivo para detecção de ESBL. Os resultados do presente trabalho demonstraram a necessidade do monitoramento constante do perfil de resistência bacteriana, que varia ao longo dos anos e difere de local para local. Com a utilização indiscriminada das drogas antimicrobianas que acontece tanto na medicina humana como na medicina veterinária, o número de isolados multirresistentes vem crescendo, dificultando ainda mais o tratamento destas infecções. A não identificação dessas bactérias multirresistentes permite a sua disseminação, tornando o problema não só na medicina veterinária, mas como um grande problema para saúde pública já que esses genes de resistência podem ser passados dos animais para os humanos e vice e versa.

**Palavras-chave:** animal, ESBL, MRS, resistência antimicrobiana,

## 5.2. Introdução

Acredita-se que metade da produção dos antimicrobianos em todo mundo seja utilizada pela medicina humana, sendo que os outros 50% utilizados na profilaxia e tratamento de doenças de animais de companhia, extermínio de pragas na agricultura e como promotor de crescimento animal, principalmente em aves e suínos (MOTA et al., 2005; GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE, 2010). As mesmas classes de antimicrobianos utilizados nos seres humanos são também empregados nos animais, assim, o uso impróprio dessas drogas no tratamento de infecções em animais de companhia pode colaborar para o aparecimento de cepas multirresistentes tanto na medicina humana como veterinária (PALLO-ZIMMERMAN et al. 2010).

A resistência antimicrobiana é descrita como uma condição ao qual um micro-organismo é capaz de sobreviver à exposição à um agente antimicrobiano (BARIE, 2012), Wannmacher (2004) refere como resistência microbiana, cepas de micro-organismos capazes de multiplicarem-se em presença de doses terapêuticas ou concentrações mais altas de antimicrobianos (WANNMACHER, 2004). Segundo Ishii et al. (2011), a emergência de cepas multirresistentes gera insucessos no tratamento de diversas infecções, levando ao uso inadequado das drogas antimicrobianas, colaborando para o desenvolvimento de resistência bacteriana presente em animais e no homem. Segundo Hoekstra e Paultron (2002), o aumento da resistência às drogas dificulta a seleção empírica dos antimicrobianos a serem utilizados em tratamentos clínicos cotidianos.

A cada novo antimicrobiano introduzido na prática clínica se segue o desenvolvimento da resistência bacteriana ao mesmo. Durante as décadas iniciais da era antibiótica, a taxa de desenvolvimento de novas drogas e os padrões de uso eram de tal ordem que, quando a resistência a determinado agente antimicrobiano era detectada, este era prontamente substituído por um novo composto para tratar o patógeno resistente. Entretanto, nos últimos quinze anos, ocorreu uma aceleração no surgimento de bactérias multirresistentes, que não foi acompanhada pela indústria farmacêutica, dificultando o controle e o tratamento de diversas infecções,

especialmente as de origem hospitalar (TAVARES, 2002; SHEA, 2003; FERNANDES, 2006).

Alguns estudos mostram a existência de um risco em potencial de difusão da resistência a determinadas drogas entre animais e humanos (SEGUIN et al., 1999; COELHO et al., 2007; DUIJKEREN et al., 2008; SOARES et al., 2008), devido ao contato muito próximo desses animais com o homem e o uso indiscriminado dos antimicrobianos na rotina veterinária e na medicina, os cães e os gatos torna-se uma potencial fonte de difusão de resistência a humanos, e vice-versa, podendo assim levar a uma transmissão de bactérias multirresistentes interespecies (GUARDABASSI, 2012; MOYAERT et al., 2006; UMBER; BENDER, 2009).

A falta de conscientização e o uso desmedido e irracional desses antimicrobianos têm contribuído para o aumento das taxas de resistência que variam localmente na dependência do consumo de determinadas drogas, e tem grande importância uma vez que são os únicos medicamentos que influenciam não apenas no paciente em tratamento, mas em todo o ecossistema onde ele está inserido, com repercussões potenciais profundas (WANNMACHER, 2004). Segundo Cohen (1992) o uso inadequado de antimicrobianos em um paciente pode reduzir a eficácia em outros pacientes devida à seleção de micro-organismos resistentes.

Os índices de resistência aos antimicrobianos em animais de companhia tem se elevado consideravelmente (WITTE, 1999; WERCKETHIN et al., 2001; ISHII et al., 2011; SFACIOTTE et al., 2014). Segundo Ishii et al. (2011) e Sfaciotte et al. (2014), estudos de perfil de sensibilidade e resistência de cepas locais são necessários assim como a educação e alerta para o uso de exames para a identificação e susceptibilidade de cepas bacterianas patogênicas e conscientização no uso e prescrição de antimicrobianos. Assim, o monitoramento desta resistência torna-se necessário para a conservação da eficácia desses fármacos, evitando a emergência de cepas multirresistentes (CLARKE, 2006).

O objetivo deste estudo foi de identificar os principais antimicrobianos resistentes em amostras clínicas de cães e detectar a multirresistência dos patógenos bacterianos envolvidos.

### 5.3. Material e Métodos

Amostras de 77 cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Campus Regional de Umuarama (CAU), foram utilizadas neste estudo. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Animal – UEM/CAU.

As amostras foram inicialmente incubadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Himedia®) a 36°C por 2 a 18 horas, conforme turvação do caldo, sendo sequencialmente inoculados em ágar Sangue de Ovelha desfibrinado a 5% (Himedia®) e ágar MacConkey (Himedia®). A identificação bacteriana foi realizada utilizando a observação das características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas, conforme ANVISA (2012). A susceptibilidade antimicrobiana foi realizada em ágar Muller Hinton (Himedia®), pelo método de disco-difusão segundo Bauer et al. (1966). Os halos de inibição foram avaliados segundo as normas M31-A3 do CLSI (2008) e CLSI (2013).

Os antimicrobianos testados, assim como suas classes e respectivas doses estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3:** Lista de antimicrobianos testados de acordo com a classe e sua respectiva concentração

CLASSE	ANTIMICROBIANO	DOSE
<b>β-lactâmico penicilínico</b>	Penicilina G	10U
<b>β-lactâmico aminopenicilínico</b>	Amoxacilina	10µg
	Ampicilina	10µg
<b>β-lactâmicos aminopenicilínicos associados a inibidores de beta-lactamases</b>	Amoxacilina+ácido clavulônico	30mcg
	Ampicilina+sulbactam	20µg
<b>β-lactâmico penicilínico semi-sintético</b>	Oxacilina	1µg
<b>β-lactâmicos ceféns cefalosporínicos</b>	Cefalexina	30mcg
	Cefalotina	30µg
<b>β-lactâmicos cefén cefamicínico</b>	Ceftriaxona	30µg
	Cefoxitina	30mcg
<b>β-lactâmicos carbapenêmicos</b>	Imipenem	10mcg
	Meropenem	10µg
<b>Glicopeptídeo:</b>	Vancomicina	30µg
<b>Polipeptídeo:</b>	Polimixina B	300µg
<b>Aminoglicosídeos</b>	Gentamicina	10µg
	Estreptomicina	10µg

	Amicacina	30µg
	Neomicina	30µg
	Tobramicina	10µg
<b>Macrolídeos</b>	Eritromicina	15µg
	Azitromicina	15µg
<b>Lincosamina</b>	Clindamicina	2µg
<b>Ansamicina</b>	Rifampicina	5µg
<b>Fenicol</b>	Cloranfenicol	30µg
	Enrofloxacin	5µg
<b>Fluoroquinolona</b>	Norfloxacin	10µg
	Ciprofloxacin	5µg
	Levofloxacin	5µg
<b>Tetraciclina</b>	Tetraciclina	30µg
	Doxiciclina	30µg
<b>Inibidor do PABA</b>	Sulfazotrim	25µg

A detecção fenotípica de cepas multirresistentes de importância em saúde pública foi realizada por disco-difusão utilizando os seguintes antimicrobianos: para MRS (*Staphylococcus* spp. metilina resistente), oxacilina e cefoxitina, segundo CLSI (2008) e CLSI (2013); para MRS-MLSb (MRS resistente ao grupo dos Macrolídeos, Lincosaminas e Streptogamina B), eritromicina e clindamicina, segundo Kim et al. (2004); para ESBL (enterobactérias de espectro ampliado a beta-lactamases), com presença de halo fantasma entre amoxicilina+clavulonato e aztreonam, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona e cefepima, segundo Souza Júnior et al. (2004) e CLSI (2013); e para VRE (*Enterococcus* spp. resistente a vancomicina), a vancomicina, segundo CLSI (2008) e CLSI (2013).

Detecção de isolados multirresistentes: O índice MAR (múltipla resistência antimicrobiana), calculado pelo número de antimicrobianos resistentes divididos pelo número de antimicrobianos testados, foi avaliado segundo Krumperman (1983). Outro índice avaliado foi o índice MCAR (múltipla resistência a classe antimicrobiana), calculado pela razão entre o número de classes consideradas resistentes (pelos menos uma droga por classe) e o número total de classes testadas (KRUMPERMAN, 1983). Foram consideradas multirresistentes as estirpes que mostraram fenótipo resistente a pelo menos três classes antimicrobianas testadas (MCAR maior ou igual a 0,25) (NGOI e THONG, 2013).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva para cálculo das frequências absoluta e relativa (PETRIE e WATSON, 2009; SAMPAIO, 2010).

#### 5.4. Resultados e Discussão

As 77 amostras estudadas compreenderam 23 amostras cutâneas, 14 oftálmicas, 13 otológicas, 13 vaginais, cinco urinas, quatro amostras nasais e cinco outros (leite, fragmento ósseo, swab oral, dois não relatados). A distribuição da frequência bacteriana nas diferentes amostras é mostrada na Tabela 4, sendo que a resistência geral foi verificada em 45,24% de infecções cutâneas, seguida de 35,13% em conjuntivites, 33,12% em cistites, 29,92% em piometras, 28,82% em otites, 22,62% em infecções do trato respiratório superior e 37,22% para outras infecções, sendo as de maior resistência as amostras de swab oral e fragmento ósseo.

**Tabela 4:** Distribuição em frequência total e frequência de MAR $\geq$ 0.2 das cepas bacterianas encontradas nos diferentes sistemas orgânicos caninos com infecção.

Cepa bacteriana	Gram positivos		Gram negativo				Total	
	total	MAR $\geq$ 0.2	Fermentador		Não fermentador		Total	MAR $\geq$ 0.2
			Total	MAR $\geq$ 0.2	total	MAR $\geq$ 0.2		
<b>Tegumentar</b>	17	16	12	10	0	0	29	26
<b>Oftálmicas</b>	15	10	6	4	0	0	21	14
<b>Auricular</b>	13	7	1	1	2	2	16	10
<b>Vaginal</b>	8	6	9	6	0	0	17	12
<b>Urinária</b>	1	0	4	3	1	1	6	4
<b>Secreção nasal</b>	4	1	2	1	0	0	6	2
<b>Mamária</b>	1	1	0	0	0	0	1	1
<b>Ósseo</b>	0	0	1	1	0	0	1	1
<b>Oral</b>	1	1	0	0	0	0	1	1
<b>Outros</b>	1	1	1	1	0	0	2	2
<b>TOTAL</b>	<b>61</b>	<b>43</b>	<b>36</b>	<b>27</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>100</b>	<b>73</b>

Foram obtidos isolados bacterianos simples de 59 amostras, culturas mistas com dois tipos bacterianos em 14 amostras, com três tipos bacterianos em três amostras e com quatro tipos bacterianos em uma amostra. Foi possível identificar 100 isolados bacterianos sendo 61 isolados Gram positivos (55 *Staphylococcus* spp., quatro *Enterococcus* spp. e dois *Streptococcus* spp.) e 39 isolados Gram negativos (36 fermentadores, sendo 12 *Escherichia coli*, quatro *Enterobacter* spp., quatro *Proteus* spp., quatro *Providencia* spp., três *Serratia* spp., três *Pantoea agglomerans*, dois *Citrobacter* spp., uma *Salmonella* spp. e três não identificados; três não fermentadores – *Pseudomonas* spp.), como mostra a Tabela 5. Os índices de resistência a antimicrobianos (MAR) variaram entre 0 e 0.82. Considerando este índice, a média das amostras estudadas foi de 0.35. Utilizando o padrão de Krumpferman (1983), também utilizado por Arias et al. (2008) e Sfaciote et al (2014),

onde índices  $\geq 0,2$  indicam multirresistência, o presente estudo encontrou 73 (73%) dos 100 isolados com multirresistência. Apenas cinco isolados se mostraram sensíveis a todas as drogas testadas. Considerando o índice MCAR, a média das amostras estudadas foi de 0.48, variando de 0 a 1. Setenta e quatro isolados bacterianos apresentaram índice MCAR superior a 0.25 ou resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo consideradas multirresistentes segundo Ngoi e Thong (2013). Dezesesseis amostras apresentaram MCAR superior a 0.8, onde duas amostras foram resistentes a todas as classes testadas, sendo no entanto, isoladamente, sensíveis a alguns poucos antimicrobianos.

**Tabela 5:** Distribuição em frequência, índice MAR médio e frequência de bactérias multirresistentes encontrados em isolados bacterianas obtidas de infecções de cães do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá.

Cepa bacteriana		Frequência	MAR (médio)	Freq MAR $\geq 0.2$
<b>Cocos G+</b>	<i>Staphylococcus</i> spp.	55	0.369	39
	<i>Enterococcus</i> spp.	4	0.258	3
	<i>Streptococcus</i> spp.	2	0.222	1
<b>Total G+</b>		<b>61</b>	<b>0.348</b>	<b>43</b>
<b>Fermentadores</b>				
<b>Coco/bacilo G-</b>	<i>Escherichia coli</i>	12	0.347	8
	<i>Enterobacter</i> spp.	4	0.372	3
	<i>Proteus</i> spp	4	0.388	4
	<i>Providencia</i> spp.	4	0.218	2
	<i>Serratia</i> spp.	3	0.382	2
	<i>Pantoea agglomerans</i>	3	0.298	2
	<i>Citrobacter</i> spp	2	0.481	2
	<i>Salmonella</i> spp.	1	0.307	1
	Não identificado	3	0.394	3
	<b>Não Fermentadores</b>			
	<i>Pseudomonas</i> spp.	3	0.428	3
<b>Total G-</b>		<b>39</b>	<b>0.428</b>	<b>30</b>
<b>Total geral</b>		<b>100</b>	<b>0.351</b>	<b>73</b>

Arias et al. (2008) estudando amostras de feridas cirúrgicas infectadas, detectaram 19 das 23 amostras estudadas com índice MAR  $\geq 0.2$ , sendo três com valor de 1. Sfaciotte et al. (2014) isolaram 89,4% amostras com MAR  $\geq 0.2$ . Ambos estudos encontraram médias do índice altas, porém estudaram poucas amostras e testaram uma pequena quantidade de drogas antimicrobianas. Mateu e Martin (2001), Mota et al. (2005) e Arias e Carrilho (2012) relatam um aumento gradativo de multirresistência a antimicrobianos na Medicina Veterinária ao longo das últimas décadas.



Um total de 2722 testes com drogas antimicrobianas foram realizados neste estudo, dos quais, 35,67% (971) foram considerados resistentes e 8,93% (243) foram consideradas com resistência intermediária, segundo padrões de halos para disco-difusão recomendados pelo CLSI (2008), considerando-se assim, 44,59% (1214) das amostras com algum tipo de resistência. As amostras reportadas com resistência intermediária foram computadas como resistente para efeitos estatísticos, uma vez que também não é aconselhável o seu uso na clínica médica.

A oxacilina e a cefoxitina são, segundo CLSI (2008), drogas para a predição de resistência em *Staphylococcus* spp. a todos os beta-lactâmicos, sendo chamado de *Staphylococcus* spp. resistente a meticilina (MRS). No presente trabalho, das 55 amostras de *Staphylococcus* spp., 36 (65,45%) foram resistentes a oxacilina e/ou cefoxitina, demonstrando a presença de MRS em 36% do total de amostras testadas. Segundo CLSI (2008), amostras MRS devem ser relatadas como resistentes a todas as drogas beta-lactâmicas, incluindo os penicílicos, cefalosporínicos, monobactâmicos e carbapenêmicos. Pereira et al. (2009) também relatam a detecção de MRS, através da resistência a oxacilina com detecção do gene *mecA* (gene que confere resistência aos beta-lactâmicos) em 15% das amostras de *Staphylococcus* obtidas de cães e gatos, metade do valor encontrado por Bemis et al (2009) (30%) em isolados de *S. pseudintermedius* em cães. Outro gene de resistência semelhante ao *mecA* e que também confere resistência aos beta-lactâmicos é o gene *mecC*, sendo que maioria das amostras MRSA *mecC* apresentam fenotipicamente resistência a cefoxitina, porém sensibilidade a oxacilina, o que difere do gene *mecA* que apresenta resistência a ambos (CARTWRIGHT et al., 2013). Nesse estudo não foi realizado a detecção de MRS através dos genes *mecA* e *mecC*, no entanto, fenotipicamente, 80,56% (29/36) indicam a presença do gene *mecA*, 5,56% (2/36) a presença do gene *mecC* e 13,89% (5/36) apresentaram resistência somente a oxacilina, mostrando outro possível mecanismo de resistência, a hiperprodução de beta-lactamase.

Das 19 amostras MSS (*Staphylococcus* spp. sensível a meticilina), 57,9% foram resistentes à penicilina e ampicilina e 50% a amoxacilina, no entanto, quando associados à inibidores de beta-lactamases, estes tiveram um percentual de resistência de 0% com ampicilina associada à sulbactam e 5,26% com amoxacilina com clavulonato. As bactérias gram negativas apresentaram resistência semelhante nas aminopenicilinas (82% para amoxacilina e 76,32% para ampicilina), mostrando

melhora na sensibilidade quando associada amoxicilina com clavulonato (63,16%) e ampicilina com sulbactam (25,81%). Dados semelhantes aos encontrados por Sfaiotte et al. (2014) e Bordin et al. (2014), sendo assim, antimicrobianos recomendados para o uso na clínica médica e cirúrgica em medicina veterinária.

Os cefalosporínicos são outro grupo de antimicrobianos pertencentes à classe dos beta-lactâmicos, sendo testadas as cefalosporinas de 1<sup>o</sup> geração: cefalexina e cefalotina; e a cefalosporina de 3<sup>o</sup> geração, ceftriaxona. Nos isolados Gram positivos, o perfil de resistência frente às cefalosporinas foi semelhante nas três drogas testadas, tendo uma susceptibilidade de 62,3% para cefalexina, 61,67% para cefalotina e 63,33% para ceftriaxona, porém, como mencionado a cima, aos isolados MRS não é recomendado o uso de nenhum beta-lactâmico, uma vez que o mecanismo de ação é semelhante, assim, das 19 amostras MSS, 84,21% (cefalexina), 78,95% (cefalotina) e 89,47% (ceftriaxona) apresentaram-se sensíveis a esse grupo e portanto sendo aconselhável o seu uso. Quando avaliado em gram negativas, as cefalosporinas de 1<sup>a</sup> geração (cefalotina e cefalexina) mostraram resistência de 74,36 e 66,67%, respectivamente, já a ceftriaxona mostrou melhor eficácia, com 35,9% de resistência. Dados também semelhantes aos encontrados por Arias et al. (2008), Sfaiotte et al. (2014) e Bordin et al. (2014).

Os carbapenêmicos possuem uma estrutura química semelhante a das penicilinas, porém com características químicas que lhes confere maior afinidade as PBPs (proteínas ligadoras de penicilinas), mostrando maior potência e um espectro antibacteriano ampliado. No entanto, não são indicados contra MRS. O uso de carbapenêmicos em medicina veterinária no Brasil foi relatado pela primeira vez por Montiani-Ferreira et al. (1999), porém a sua difusão não é ampla neste meio. Os carbapenêmicos avaliados neste estudo mostraram 5% de resistência ao meropenem e 1,51% ao imipenem, porém, considerando-se que sua atividade antimicrobiana pode ser prejudicada em MRSs, o uso de carbapenêmicos não é indicado em 36% (36/100) dos isolados avaliados. Apesar de não existirem normas claras que proíbem o uso de carbapenêmicos na medicina veterinária, estes antimicrobianos devem ser utilizados com muita cautela a fim de evitar a pressão de seleção de clones resistentes e a transmissão de resistência a outras bactérias, potencialmente contactantes com humanos.

Após a descoberta de bactérias gram positivas multirresistente, principalmente os MRS, os antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos,

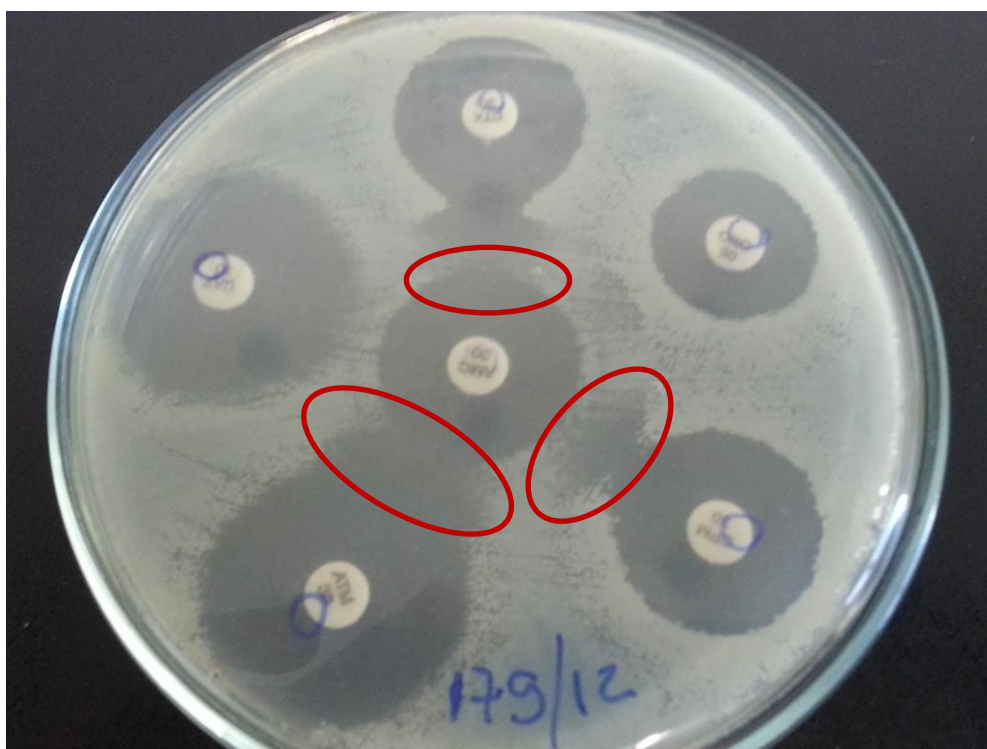
vancomicina e teicoplanina, foram considerados por muito tempo a última alternativa para o tratamento contra estes micro-organismos na medicina. Na medicina humana já foram isolados cepas de *Staphylococcus* com resistência intermediária a vancomicina (VISA) (HIRAMATSU et al. 1997) e *Staphylococcus* resistentes a vancomicina (VRSA) (CHANG et al. 2003), na medicina veterinária, segundo Monchique (2013), nenhuma amostras VRSA foi identificada.

A vancomicina é um antimicrobiano importante no tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* spp, com o aparecimento de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE), a eficiência desse antibiótico tornou-se limitada, sendo, hoje, considerada uma das bactérias mais importantes clinicamente resistentes aos antimicrobianos em todo o mundo, pois são poucos os agentes terapêuticos capazes de tratar infecções causadas por esse micro-organismo e ainda pela grande facilidade de transmissão desta resistência a outras bactérias, especialmente *Staphylococcus* spp., já comentado (EISNER et al., 2005; FUJITA et al., 1998).

Os resultados encontrados neste estudo, utilizando a disco-difusão, mostram que das 55 amostras de *Staphylococcus* spp. encontradas, 32 (58,18%) foram susceptíveis *in vitro* a vancomicina e 23 necessitam de nova avaliação por CIM para este antimicrobiano, uma vez que de acordo com o CLSI (2008) somente pode ser reportado VISA e VRSA, através do CIM. Para *Enterococcus* spp. é aceita a técnica de disco-difusão, onde foram encontradas duas cepas VRE ambas com índices MAR maiores que 0,2, ou seja, deve-se monitorar extensivamente a presença tanto de VRE quanto MRS, VISA e VRSA em ambientes hospitalares veterinários, reportando-se casos e investigando a sua origem. Assim como os carbapenêmicos, os glicopeptídeos devem ser utilizados com muita cautela na medicina veterinária a fim de evitar os processos de seleção de micro-organismos resistentes a estas duas classes, que pode resultar na resistência cruzada entre animais e humanos e dificultar o tratamento de pacientes das duas áreas.

Um dos mecanismos mais importantes de resistência encontrados em micro-organismos da família das *Enterobacteriaceae* é a inativação pela hidrólise do anel beta-lactâmico, chamadas de bactérias com beta lactamase de espectro estendido (ESBL), conferindo resistência aos antimicrobianos da classe das cefalosporinas e monobactâmicos (COQUE et al., 2008). Vários estudos já reportaram o isolamento de ESBL em amostras clínicas provenientes de animais de companhia (DIERIKX et al., 2012; EWERS et al., 2012). No presente estudo, 61,54% (24/39) das amostras

foram positivas no teste presuntivo para detecção de ESBL segundo Souza Jr et al. (2004) e o CLSI (2013), assim como mostra a Figura 5, dentre as quais oito (33,33%) isolados de *E. coli*, quatro (16,67%) de *Providencia* spp., três (12,5%) de *Proteus* spp. e *Serratia* spp., dois (8,33%) de *Enterobacter* spp. e *Pantoea agglomerans* e um (4,17%) de *Citrobacter* spp. e *Pseudomonas* spp., valores esses acima do encontrado por Bordin et al. (2014), 16,7%. Das 24 amostras produtoras de ESBL, apenas cinco (20,83%) apresentaram índice MAR abaixo de 0,2, mostrando a multirresistência encontrada nesses micro-organismos.



**Figura 5:** Detecção de isolados ESBL através da presença de halo fantasma (círculos vermelhos) entre amoxicilina+clavulonato e aztreonam, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona e cefepima.

Em relação aos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos, cinco drogas foram testadas, sendo elas: ampicacina, gentamicina, neomicina, tobramicina e estreptomicina, com percentual de resistência de 18,56%, 23,23%, 50%, 29,29% e 41,41% respectivamente, onde com exceção da neomicina, todas mostraram uma melhor eficácia em isolados Gram negativos. Ishi et al. (2011) detectaram resistência a gentamicina em 36,6% dos isolados avaliados, 65,4% para neomicina e 33,3% para tobramicina, valores esses maiores do que no presente estudo, já Sfaciotte et al. (2014) encontraram resistência em apenas 12,5% das amostras testadas para gentamicina, semelhante a Soares et al. (2008), com 12,5% e 15,6% em amostras

de cães e humanos, respectivamente. Quando verificado a resistência nos isolados de MRS, todos os percentuais obtiveram aumento, com 38,89% para gentamicina, 68,57% para estreptomicina, 36,11% para amicacina, 66,67% para neomicina e 47,22% para tobramicina, limitando o uso dessa classe para esse tipo de micro-organismo multirresistente, diferentemente do que ocorre para as ESBL, onde foi verificado uma melhor sensibilidade frente a essas drogas com apenas 4,35% de resistência para amicacina, 20,83% para gentamicina, 37,5% para estreptomicina, 25% para tobramicina e 50% para neomicina, tornando com exceção da estreptomicina e a neomicina, antimicrobianos elegíveis para infecção causada por esses micro-organismos.

Macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B formam o grupo MLSb de antibióticos, pois apesar de possuírem fórmulas diferentes, apresentam o mesmo mecanismo de ação, inibindo a síntese proteica através da ligação ao receptor 23s do rRNA que faz parte da subunidade 50s do ribossomo bacteriano. Desde 1956, logo após a introdução da eritromicina no mercado, já se via resistência do *Staphylococcus aureus* ao grupo MLSb (ROSSI e ANDREAZZI, 2005; LECLERCQ, 2002). Na medicina veterinária, a clindamicina é amplamente utilizada, indicada também em infecções causadas por *Staphylococcus*, principalmente os MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) (FIEBELKORN et al., 2003). Epidemiologicamente, a resistência cruzada entre essas três classes de antimicrobianos é muito importante (DIPERSIO e DIPERSIO, 2005), uma vez que são amplamente utilizados na medicina veterinária levando ao aumento de resistência de origem animal. Em MRSA isolados de seres humanos e animais, a resistência a clindamicina induzida já é bem documentada (RUBIN et al., 2011). Sabe-se que a pressão antimicrobiana acarreta na seleção de bactérias resistentes ao grupo MLSb, porém a transferência horizontal de genes de resistência também é bem elucidada (PATTERSON et al., 2007).

Os macrolídeos testados apresentaram resistência de 71,19% para eritromicina (testada somente em Gram positivos) e 57,58% a azitromicina (49,18% em Gram positivos e 71,05% em Gram negativos), resultados semelhantes aos encontrados por Pereira et al. (2009), que detectaram 47,3% de resistência a azitromicina, mostrando uma maior resistência a azitromicina em bacilos Gram negativos. Já a lincosamida testada (clindamicina) apresentou resistência em 75,51% dos isolados, com maior resistência em Gram negativos (92,1%), sendo que

Ishii et al. (2011) encontrou resistência a clindamicina em 82,3% das amostras e Sfaiote et al. (2014) em 100%. Em isolados MRS, a resistência ao grupo MLSb foi de 88,57% para eritromicina, 66,67% para azitromicina e 80,56% para clindamicina. 94,44% (34/36) dos isolados MRS apresentaram resistência a pelo menos um desses antimicrobianos, resultado muito próximo de Kim et al. (2004) que constataram resistência em 97% dos MRSA.

O cloranfenicol apresentou resistência em 21,43% dos isolados estudados, com 18,64% em gram positivas e 25,64% em gram negativas. Cruz et al. (2012) detectaram em isolados bacterianos de cães, a resistência ao cloranfenicol em bacilos Gram negativos de 35,19%, enquanto que a resistência ao grupo dos *Staphylococcus* de 9,52%. Bordin et al. (2014) relatam a resistência ao cloranfenicol em 19% das amostras estudadas, com sensibilidade maior para as gram positivas. Sfaiote et al. (2014) e Mantilla e Franco (2012) encontraram valores superiores em seus estudos, 56% e 59,2%, respectivamente. Resistência ainda superior a estas foi encontrada por Mesquita et al. (2009) com 85,71%. Para isolados MRS detectados no presente estudo, o cloranfenicol foi o antimicrobiano que melhor apresentou sensibilidade, 74,29% (27/36), sendo portando o mais indicado para tratamento desse tipo de micro-organismo.

As quinolonas, principalmente a enrofloxacin, são um dos principais antimicrobianos usados na rotina médica-veterinária, pois além de sua fácil aquisição, mostra-se eficiente para grande parte de tratamentos antimicrobianos empíricos, apresenta relativa segurança (COHN et al., 2003) e amplo espectro de ação (PALLO-ZIMMERMAN et al., 2010). No entanto, o aumento da resistência às fluorquinolonas provavelmente tem relação com sua ampla utilização em medicina veterinária. Segundo Cohn et al. (2003), 7,73% dos pacientes, quando atendidos pela primeira vez já estavam sendo medicados com este antimicrobiano, uma vez que a sua aquisição pode ser feita sem receita em farmácias veterinárias, levando assim ao seu uso indiscriminado. As bactérias gram negativas são historicamente consideradas sensíveis às fluorquinolonas, mas a resistência a essa classe de antimicrobianos progrediu consideravelmente, ocorrendo por mutação, bomba de efluxo e perda de porina, porém atualmente é também mediada por plasmídeos, o que se acreditava não ocorrer nesta classe (GIBSON et al., 2010; PALLO-ZIMMERMAN et al., 2010; ISHII et al., 2011). Cohn et al. (2003), que ao estudarem a tendência do desenvolvimento de resistência às fluorquinolonas em isolados

bacterianos do trato urinário de cães, detectaram um aumento da resistência ao longo dos anos, porém essas drogas ainda foram consideradas eficazes em mais de 80% dos isolados testados *in vitro*. No presente estudo foram utilizados quatro antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, sendo três deles considerados de 2<sup>o</sup> geração (norfloxacin, enrofloxacin e ciprofloxacin) e um da 3<sup>o</sup> geração (levofloxacin), com percentuais de 44% para enrofloxacin, 36% para norfloxacin, 39,74% para ciprofloxacin e 32% para levofloxacin, valores esses acima dos encontrados por Zacarias Junior et al. (2012) para ciprofloxacin (25%) e norfloxacin (20,8%), porém menores dos encontrados por Ishii e colaboradores em 2011 para enrofloxacin (53,8%) e ciprofloxacin (42,8%). Diferente de Sfaciote et al. (2014), o percentual de resistência foi maior em isolados Gram positivos, principalmente em MRS, que apresentaram 77,78% de resistência frente a classe (de acordo com o CLSI a resistência a um antimicrobiano da classe das fluorquinolonas confere resistência a classe toda).

Na classe dos inibidores do PABA, o sulfazotrim avaliado apresentou resistência em 52,08% dos isolados, 53,33% em Gram positivos, 50% em Gram negativos, 68,57% em MRS e 58,33% em ESBL. Sfaciote et al. (2014) encontraram resistência em 100% das amostras estudadas, Arias et al. (2008), 92,3% (12/13) em amostras de feridas contaminadas e infectadas e Dal-Bó et al. (2013), 75% em *Staphylococcus* e 50% em bacilos Gram negativos. Já Cruz et al. (2012) detectaram resistência em 35,19% para as bactérias gram negativas e 52,38% nos *Staphylococcus*. Esses altos índices de resistência aos antimicrobianos da classe das sulfas pode ser explicado devido a sua ampla utilização durante muitos anos na medicina veterinária, sem muitas vezes critério (CRUZ et al., 2012).

A rifampicina com 63,29% de resistência (43,48% em Gram positivos, 91% em Gram negativos, 62,07% em isolados MRS e 90,48% em ESBL), assim como a tetraciclina e a doxiciclina da classe das tetraciclinas, que apresentaram 56% e 48% respectivamente, não são aconselháveis para terapia empírica antimicrobiana, principalmente em cepas multirresistentes, assim como descrito por Bordin et al. (2014).

Neste estudo, foram detectadas 73% (74/100) de cepas multirresistentes de grande importância como MRS (36%), MLSb (11%), VRE (2%) e ESBL (24%). A sua identificação precoce em animais, torna-se assim, um importante passo para minimizar a transmissão de resistência antibacteriana. O aumento do número das

bactérias multirresistentes em animais e humanos mostra a necessidade de desenvolver e implementar medidas para monitorar e controlar a difusão de resistência (UMBER e BENDER, 2009; ISHII et al., 2011). É possível que o aumento dessa resistência esteja associado à constante exposição por estas drogas e a sucessiva pressão seletiva, ocasionando na transferência de gene de resistência entre cepas (SOARES et al., 2008).

### 5.5. Conclusão

Os resultados do presente trabalho indicam que o principal micro-organismo isolado de infecções nos diferentes sistemas orgânicos caninos é o *Staphylococcus* spp, seguido dos bacilos Gram negativos fermentadores de açúcares pertencentes a família das *Enterobacteriaceae*.

As principais classes antimicrobinas resistentes foram os beta-lactâmicos, principalmente pela detecção fenotípica cepas resistentes (MRS e ESBL), já o cloranfenicol foi o fármaco que mais demonstrou sensibilidade nas amostras que se apresentaram multirresistentes.

Foram detectados cepas multirresistentes de grande importância para saúde pública, como os MRS, VRE, MLSb e ESBL, demonstrando a necessidade do monitoramento constante do perfil de resistência bacteriana, que varia ao longo dos anos e difere de local para local. A realização de testes para identificação bacteriana e sua suscetibilidade podem auxiliar na seleção apropriada do agente antimicrobiano, mostrando-se essencial para a clínica médica e cirúrgica devido a altas taxas de resistência bacteriana verificadas nesta e em outras pesquisas, assim como o monitoramento da resistência local com o uso contínuo de determinadas drogas antimicrobianas. A escolha prudente da antibioticoterapia adotada reduz o uso de antimicrobianos e consequentemente o desenvolvimento de resistência bacteriana pela seleção, principalmente em ambientes hospitalares.

Com a utilização indiscriminada das drogas antimicrobianas que acontece tanto na medicina humana como na medicina veterinária o número de isolados multirresistentes vem crescendo. A emergência de cepas multirresistentes já é uma realidade na medicina veterinária que deve ser melhor observada pelos profissionais tanto clínicos quanto cirurgiões.



## 5.6. Referências

- ANVISA. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde – Módulo 6: detecção e identificação e bactérias de importância médica. 2ª Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília: ANVISA, 2013.
- ARIAS, M.V.B. e CARRILHO, C.M.D.M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.775-790, 2012.
- ARIAS, M.V.B.; BATAGLIA, L.A.; AIELLO, G.; CARVALHO T.T; FREITAS, J.C. Identificação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de cães e gatos com feridas traumáticas contaminadas e infectadas. **Semina**, v.29, p.861-874, 2008.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C; TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** v.45, p.493-496, 1966.
- BARIE, P. S. Multidrug-resistant organisms and antibiotic management. **Surgical Clinics North America**, v. 92, n. 2, p. 345-391, 2012.
- BORDIN, J.T.; SFACIOTTE, R.A.P.; CORONEL, L.G.; MENDES, L.M.; VIGNOTO, V.K.C.; DE CONTI, J.B.; WOSIACKI, S.R. Identificação de cepas bacterianas multirresistentes isoladas de feridas de pequenos animais do Hospital Veterinário da UEM. **Pesq. Vet. Bras.** (artigo enviado), 2014.
- CARTWRIGHT, E.J.P.; PATERSON, G.K.; RAVEN, K.E.; HARRISON, E.M.; GOULIOURIS, T.; KEARNS, A.; PICHON, B.; EDWARDS, G.; SKOV, R.L.; LARSEN, A.R.; HOLMES, M.A.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S.J; TOROK, M.E. Use of Vitek 2 antimicrobial susceptibility profile to identify *mecC* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.** v.51, p.2732–2734, 2013.
- CHANG, S.; SIEVERT, D.M.; HAGEMAN, J.C.; BOULTON, M.L.; TENOVER, F.C.; DOWNES, F.P.; SHAH, S.; RUDRIK, J.T.; PUPP, J.R.; BROWN, W.J.; CARDO, D.; FRIDKIN, S.K. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. **N. Engl. J. Med.** v.348, p.1342-1347, 2003.
- CLARKE, C.R. Antimicrobial resistance. **Small Anim. Pract.**, v.36, p.987-1001, 2006.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3rd ed. Approved standard M31-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2013.
- COELHO, S.M.O.; MORAES, R.A.M.; SOARES, L.C.; PEREIRA, I.A.; GOMES, L.P.; SOUZA, M.M.S. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em

*Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência rural** v.37, n.1, p.195-200, 2007.

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**, v.257, p.1050-1055, 1992.

COHN, L.A.; GARY, A.T.; FALES, W.H.; MADSEN, R.W. Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. **J. Vet. Diagn. Invest.** v.15, p.338-343, 2003.

COQUE, T.M; BAQUERO, F.; CANTO, N.R. Increasing prevalence of ESBL producing *Enterobacteriaceae* in Europe. **Eurosurveill** v.13, p.19044, 2008.

CRUZ, A.R.; PAES, A.C.; SIQUEIRA, A.K. Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. **Revista Veterinária e Zootecnia** v.19, n.4, p.601-610, 2012.

DAL-BÓ, I.S., FERRIGNO, C.R.A., FERREIRA, M.P., CAQUIAS, D.F.I., SOUZA, A.N.A., RIZZO, M.F.C.I., CAVALCANTI, R.A.O., SANTOS J.F.. Infecção óssea após osteotomia para tratamento da ruptura de ligamento cruzado em cães. **Revista Acta Scientiae Veterinariae** v.41, p.1148, 2013.

DIERIKX, C.M., VAN DUIJKEREN, E., SCHOORMANS, A.H., VAN ESSEN-ZANDBERGEN, A., VELDMAN, K., KANT, A. Occurrence and characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. **J. Antimicrob. Chemother.** v.67, p.1368–1374, 2012.

DIPERSIO, J.R. e DIPERSIO, L.P. Update on the prevalence and spread of macrolide and lincosamide-resistant staphylococcal and streptococcal species. **Rev. Med. Microbiol.** v.16, p.117–123, 2005.

DUIJKEREN, E., IKAWATY, R., WAGENAAR, J.A. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* between humans and animals. **Vet. Microbiol.** v.128, p.213-215, 2008.

EISNER, A., FEIERL, G., GORKIEWICZ, G., DIEBER, F., KESSLER, H.H., MARTH, E., KÖFER J. High prevalence of vanA-type vancomycin-resistant enterococci in Austrian poultry. **Applied and Environmental Microbiology** v.71, p.6407–6409, 2005.

EWERS, C., BETHE, A., SEMMLER, T., GUENTHER, S., AND WIELER, L.H. Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. **Clin. Microbiol. Infect.** v.18, p.646–655, 2012.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development-the failure of success? **Nat. Biotechnol.**, v.24, p.1497-503, 2006.

FIEBELKORN, K.R., CRAWFORD, S.A., MCELMEEL, M.L., JORGENSEN J.H. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in

*Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.4740-4744, 2003.

FUJITA, N., YOSHIMURA, M., KOMORI, T., TANIMOTO, K., IKE, Y. First report of the isolation of high-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v.42, p.2150, 1998.

GIBSON, J.S., COBBOLD, R.N., HEISIG, P., SIDJABAT, H.E., KYAW-TANNER, M.T., TROTT, D.J. Identification of Qnr and AAC(6')-1b-cr plasmid-mediated fluoroquinolone resistance determinants in multidrug-resistant *Enterobacter* spp. isolated from extraintestinal infections in companion animals. **Vet Microbiol**, v.143, p.329–336, 2010.

GUARDABASSI, L. Veterinary hospital-acquired infections: The challenge of MRSA and other multidrug-resistant bacterial infections in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v.193, p.307–308, 2012.

GUARDABASSI, L., JENSEN, L.B., KRUSE, H. Guia de Antimicrobianos em Veterinária – Novo. Artmed: 2010.

HIRAMATSU, K., HANAKI, H., INO, T., YABUTA, K., OGURI, T., TENOVER F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J Antimicrob Chemother**, v.40, p.135–136, 1997.

HOEKSTRA, K.A. e PAULTRON R.J.L. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* in dogs. **J. Appl. Microbiol.** v.93, p.406-413, 2002.

ISHII, J.B., FREITAS, J.C., ARIAS, M.V.B. Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina(2008-2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31, n.6, p.533-537, 2011.

KIM, H.B., LEE, B., JANG, H.C., KIM, S.H., KANG, C.I., CHOI, Y.J., PARK, S.W., KIM, B.S., KIM, E.C., OH, M.D., CHOE, K.W. A high frequency of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance determinants in *Staphylococcus aureus* isolated in South Korea. **Microb Drug Resist.** v.10, n.3, p.248-254, 2004.

KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk source of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, v.46, n.1, p.165-170, 1983

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance of macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clin Infect Dis.** v.34, n.4, p.482-492, 2002.

MANTILLA, S.P.S. e FRANCO R. M. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens patogênicas de *Escherichia coli* isoladas de carne bovina. **Colloquium Agrariae** v.8, n.1, p10-17, 2012.

MATEU, E.; MARTIN, M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? **Vet. Public Health**, v. 48, n. 8, p. 569-81, 2001.

MESQUITA, A.M.R.C., LIMA, N.L., LIMA, A.A.M. Avaliação da susceptibilidade e resistência antimicrobiana de cepas de *Shigella* spp. isoladas de pacientes com diarreia nosocomial. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.8, n.3, p.292-300, 2009.

MONCHIQUE, C.R.O. 2013. Evolução da resistência aos antibióticos em *Staphylococcus* spp. –1999 a 2006. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal. 67f.

MONTIANI-FERREIRA, F., WARTH, J.F., PACHALY, J.R., REIFUR, L., DOTTI, C.F. Contribuição ao estudo da ação da meropenema, *in vitro* e *in vivo*, em infecções diagnosticadas em pequenos animais. **Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR** v.2, p.2, 1999.

MOTA, R.A.; FRETAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, n.6, p.465-470, 2005.

MOYAERT, H.; DE GRAEF, E. M.; HAESBROUCK, F.; DECOSTERE, A. Acquired antimicrobial resistance in the intestinal microbiota of diverse cat populations. **Research in Veterinary Science**, London, v.81, n.1, p.1-7, 2006.

NGOI, S.T., THONG, K.L. Molecular characterization showed limited genetic diversity among *Salmonella Enteritidis* isolated from humans and animals in Malaysia. **Diag. Microbiol. Infec. Disease**, v.77, p.304-311, 2013.

PALLO-ZIMMERMAN, L.M., BYRON, J.K., GRAVES, T.K. Fluoro-quinolonas: Then and now. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.** v.32, p.E1-E8, 2010.

PATTERSON, A.J., COLANGELI, R., SPIGAGLIA, P., SCOTT, K.P. Distribution of specific tetracycline and erythromycin resistance genes in environmental amples assessed by macroarray detection. **Environ. Microbiol.** v.9, p.703–715, 2007.

PEREIRA, I.A., SOARES, L.C., COELHO, S.M.O., PRIBUL, B.R. SOUZA, M.M.S. Susceptibilidade á azitromicina de isolados bacterianos de processos infecciosos em cães e gatos. **Pesquisa veterinária Brasileira**. v.29, n.2, p.153-156, 2009.

PETRIE, A. e WATSON P. Estatística em Ciência Animal e Veterinária. 2ed. São Paulo: Editora Roca. 248p., 2009.

ROSSI, F e ANDREAZZI, D.B. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. Atheneu, São Paulo. 118p., 2005.

RUBIN, J.E., BALL, K.R., CHIRINO-TREJO, M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. **Can Vet J**. v.52, p.153–157, 2011.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 3ed. FEPMVZ- Editora, Belo Horizonte. 221p., 2010.

SEGUIN, J.C.; WALKER, R.D.; CARON, J.P.; KLOOS, W.E.; GEORGE, C.G.; HOLLIS, R.J.; JONES, R.N.; PFALLER, M.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 5, p. 1459-1463, may 1999.

SFACIOTTE R.A.P., VIGNOTO V.K.C. & WOSIACKI S.R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados bacterianos de afecções clínicas do hospital veterinário da Universidade Estadual de Maringá. **Rev. Ci. Vet. Saúde Public.** v.1, n.1, p.29-38, 2014.

SHEA, K. Antibiotic Resistance: What is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health? **Pediatrics.**, v.112, p.253-258, 2003.

SOARES, L.C., PEREIRA, I.A., COELHO, S.M.O., CUNHA, C.M.M., OLIVEIRA, D.F.B., MIRANDA, A.N., SOUZA, M.M.S. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. Coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciência Rural** v.38, n.5, p.1346-50, 2008.

SOUSA JUNIOR, M.A., FERREIRA, E.V., CONCEIÇÃO G.C. Betalactamase de Espectro Estendido (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab**, v.63, p.152-174, 2004.

SOUSA, J. C. 2006. Manual de antibióticos antibacterianos (2ª edição). Porto, Ed. Universidade Fernando Pessoa.

TAZIMA, M.F.G.S., VICENTE, Y.A.M.V.A., MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.41, p.259-264, 2008.

UMBER, J.K. & BENDER J.B. Pets and antimicrobial resistance. **Vet. Clin. North America: Small Animal Pract.** v.39, n.2, p.279-292, 2009.

WANNAMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? **Uso racional de medicamentos**, v.1, n.4, p.1-5, 2004.

WERCKETHIN, C. CARDOSO, M.; MARTEL, J.L.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance in Staphylococci from animal with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. **Vet. Res.**, v.32, p.341-362, 2001.

WITTE, W. Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: Epidemiological aspects. **J. Antimicrob. Chemoth.**, v.44, sup.A., p.1-9, 1999.

ZACARIAS JUNIOR, A., FREITAS, J. C., ZACARIAS, F. G. S., SALVADOR, R., GARCIA, J. L. Investigation of bacterial microbiota and risk factors in dogs with external ocular diseases from Bandeirantes, Paraná State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v.33, suplemento 2, p.3243-3250, 2012.

## 6. CAPÍTULO 3 - PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE PATÓGENOS BACTERIANOS DE PEQUENOS ANIMAIS COM DOENÇA OCULAR EXTERNA

### 6.1. RESUMO

O objetivo desse trabalho foi identificar os principais micro-organismos associados a infecções oftálmicas e determinar o perfil de resistência desses isolados frente a drogas antimicrobianas. Foram avaliados 26 isolados bacterianos provenientes de 18 afecções oftálmicas de animais de companhia (17 cães e um gato), sendo realizado o perfil de resistência fenotípica a 28 antimicrobianos de 12 classes, pesquisa de cepas multirresistentes de importância em saúde pública e detecção do gene *mecA* de *Staphylococcus* por PCR. Foram identificados 18 *Staphylococcus* spp., um *Enterococcus* spp., duas *Pantoea agglomerans*, duas *Escherichia coli*, uma *Enterobacter* spp., uma *Salmonella* spp. e uma *Pseudomonas* spp. Um total de 738 avaliações de drogas antimicrobianas foram realizadas, onde o percentual de drogas consideradas resistentes ou com resistência intermediária *in vitro* foi de 42,82% (n=316). Considerando as drogas antimicrobianas isoladas, 18 isolados mostraram-se multirresistentes, enquanto que pela avaliação da resistência às classes, 20 isolados foram considerados multirresistentes. A detecção fenotípica de MRS mostrou 61,11% (11/18) dos isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina, enquanto que a detecção genotípica, 38,89% (7/18) foram carreadores do gene *mecA*. Em relação ao perfil de resistência encontrado das estirpes bacterianas estudadas, apenas três drogas apresentaram porcentagens acima de 70% de resistência, sendo eles: penicilina (R=84,2%) e ampicilina (R=76%) e a clindamicina (R=80,77%). Com porcentagem de resistência entre 50 e 70% foram encontradas a tetraciclina (R=69,23%), a amoxacilina (R=65,38%), a eritromicina (R=67,9%, testado somente em Gram positivoss) e azitromicina (R=61,54%); o sulfazotrim (R=64%); a rifampicina (R=60%); a oxacilina (R=57,89%), avaliada apenas em Gram positivoss) e a ciprofloxacina (R=52,17%). As drogas consideradas menos resistentes foram a ceftriaxona (R=26,92%); o cloranfenicol (R=19,23%); a amicacina (R=11,54%); o sulbactam com ampicilina (R=5%), o clavulanato com amoxacilina (R=15,38), o imipenem (R=0%) e meropenem (R=0%). No presente estudo foram detectados isolados multirresistentes de grande importância e que

estão envolvidos em casos de saúde pública, como MRS, MRS-MLSb, ESBL, sendo muito importante a sua rápida identificação e controle para evitar assim a disseminação desse tipo de resistência.

**Palavras-chave:** resistência, alterações oftálmicas, MRA, ESBL, multirresistente

## 6.2. Introdução

Diferentemente do que ocorre em tecidos de órgãos internos de animais e humanos saudáveis, tecidos superficiais como pele e mucosa são colonizados por diferentes agentes, pois estão em constante contato com o ambiente. Além da frequente exposição, a superfície ocular é rica em nutrientes, o que a torna um ambiente favorável para a colonização de micro-organismos, sendo esses agentes denominados de microbiota normal, microbiota indígena, microbiota residente ou microflora (PRESCOTT et al., 2002), sendo essa aquisição iniciada durante o nascimento, assim que o feto atravessa o canal cervical (UESUGUI et al., 2002) e variando ao longo da vida (ISENBERG et al., 1994; UESUGUI et al., 2002; PRADO et al., 2005). Esses micro-organismos que compõem a microbiota residente ocular agem como importante mecanismo de defesa (WANG et al., 2008), prevenindo o surgimento de agentes patogênicos (SHIMAMURA, 2008) através da competição por nutrientes (DAVIDSON et al., 1994), por secretarem substâncias antimicrobianas (HSU e WISEMAN, 1967; FREDRICKSON, 1977), além de estimularem a resposta imune local (MOELLER et al., 2005)

Apesar dos micro-organismos indígenas da microbiota conjuntival não serem considerados patogênicos, quando ocorre uma quebra da barreira de proteção da superfície ocular (ANDREW et al., 2003), uma diminuição da imunidade do indivíduo (SOLARI et al., 2004; ORIA et al., 2011) bem como estresse ou outro fator que desencadeia um desequilíbrio entre hospedeiro e agente (HERITAGE et al., 2003), esses micro-organismos residentes podem infiltrar no estroma corneano ou ainda lesionar a conjuntiva ocular e desencadear um processo infeccioso (ARMSTRONG, 2000).

A quantidade de população bacteriana residente na conjuntiva ocular é pequena (GRAHAM et al., 2007), sendo encontradas principalmente bactérias Gram

positivas (TOLAR et al., 2006) do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* (PRADO et al., 2005), podendo também serem isoladas bactérias anaeróbicas e fungos (ANDRADE et al., 2002), além de bactérias Gram negativas, mas estas, quando em grande número, podem indicar alteração na saúde ocular (SPINELLI et al., 2010).

Existem vários estudos que identificaram a microbiota residente da conjuntiva ocular, e todos apontaram a prevalência de bactérias Gram positivas, mesmo em diferentes espécies animais, como: cães (KUDIRKIENE et al. 2006; WANG et al., 2008), carneiros (ALMEIDA NETO et al., 2006), cavalos (ANDREW et al., 2003), capivara (MONTIANI-FERREIRA et al., 2008), macaco-prego (MONTIANI-FERREIRA et al., 2008b), furão doméstico (MONTIANI-FERREIRA et al., 2006) e até mesmo animais com hábitos aquáticos, como os castores, apresentaram esse mesmo perfil (CULLEN, 2003). Existem vários fatores que influenciam a microbiota da superfície ocular dos animais, destacando-se: a raça, idade, localização geográfica, o clima, a estação do ano, densidade populacional e o modo de criação (PRADO et al., 2005; SWINGER et al., 2009). Assim como descrito por Whitley (2000), a quantidade de micro-organismos de cães mantidos em jardins é maior do que aqueles criados em apartamento, assim como animais com idade superior a dois anos e animais sem raça definida.

O principal gênero de micro-organismo isolado em alterações oftálmicas de animais é o *Staphylococcus* (PRADO et. al., 2005; 2006; WANG et. al., 2008; TARABISHY e JENG. 2008), seguidos de *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Corynebacterium* spp. e *Bacillus cereus* (TOLAR et al., 2006). Mais especificamente em cães, o *Staphylococcus pseudintermedius*, anteriormente identificado como *S. intermedius* (DEVRIESE et al., 2005), é o principal agente identificado (PRADO et. al., 2005; MONTIANI-FERREIRA et al., 2006).

Quando se compara resultados entre isolados identificados em animais que não apresentam alterações oculares e aqueles que possuem alterações, percebe-se que os gêneros bacterianos encontrados são os mesmos, o que reforça o fato de que os próprios micro-organismos residentes encontrados na microbiota normal dos animais, ao ocorrer um desequilíbrio local ou sistêmico, podem se tornar patogênicos (UESUGUI et al., 2002; SANTOS et al., 2009).

Em oftalmologia, a utilização de antimicrobianos é feita tanto para prevenção como para o tratamento de doenças, sendo assim, é de suma importância determinar a susceptibilidade dos micro-organismos frente aos antimicrobianos em



doenças oculares externas, pois o uso indiscriminado desses agentes em infecções menores prejudica o tratamento de doenças mais graves (VARGES et al., 2009). Em alguns casos, o tratamento antimicrobiano é iniciado antes da identificação do agente causador, sendo assim, a escolha do antimicrobiano é guiada pelos resultados de estudos já realizados que identificaram os principais micro-organismos causadores de enfermidades daquele determinado local (GIGUÉRE e WALKER, 2006). Na prática oftálmica, os antimicrobianos mais recomendados são: gentamicina, tobramicina, neomicina, cloranfenicol e ciprofloxacina, principalmente em isolados de *Staphylococcus* spp. (ZACARIAS JUNIOR et al., 2012).

O monitoramento da resistência antimicrobiana em micro-organismos de “origem” animal vem crescendo cada vez mais devido ao grande risco zoonótico, uma vez que essa resistência pode ser transmitida para isolados humanos, fato esse já descrito em amostras de *Staphylococcus* resistente à meticilina (MRS) (JONES, KANIA e ROHRBACH, 2007).

O uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina veterinária é um dos principais fatores que levam à seleção de micro-organismos resistentes (LLOYD, 2007). Não existem muitos estudos referentes a resistência antimicrobiana na prática oftalmológica veterinária (WANG, et al., 2008).

O objetivo desse trabalho foi identificar os principais micro-organismos associados a infecções oftálmicas e determinar o perfil de resistência desses isolados frente a drogas antimicrobianas.

### 6.3. Material e Métodos

**Obtenção das amostras:** foram avaliados 26 isolados bacterianos provenientes de 18 afecções oftálmicas de animais de companhia (17 cães e um gato) atendidos no Hospital Veterinário (HV) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), *Campus* Regional de Umuarama (CAU). A avaliação dos isolados foi realizada no Laboratório de Microbiologia Veterinária da HV-UEM-CAU.

**Identificação bacteriana:** As amostras, coletadas por swabs estéreis no Setor de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais do HV/UEM/CAU, foram incubadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, OXOID®) a 36°C por duas a 24 horas, conforme turvação do caldo, sendo sequencialmente semeados em Ágar Sangue de Ovelha desfibrinado a 5% (OXOID®) e Ágar MacConkey (OXOID®). A

identificação bacteriana foi realizada observando as características culturais, morfológicas, tintoriais e bioquímicas, conforme ANVISA (2013).

**Susceptibilidade antimicrobiana:** foi realizada em Ágar Muller Hinton (OXOID®), pelo método de disco-difusão segundo Bauer et al. (1966). Os halos de inibição foram avaliados segundo as normas M31-A3 do CLSI (2008) e M100-S23 do CLSI (2013) (R=número de resistentes).

Os antimicrobianos testados, assim como suas classes e respectivas doses estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6:** Lista de antimicrobianos testados de acordo com a classe e sua respectiva concentração

CLASSE	ANTIMICROBIANO	DOSE
<b>β-lactâmico penicilínico</b>	Penicilina G	10U
<b>β-lactâmico aminopenicilínico</b>	Amoxicilina	10µg
	Ampicilina	10µg
<b>β-lactâmicos aminopenicilínicos associados a inibidores de beta-lactamases</b>	Amoxicilina+ácido clavulônico	30mcg
	Ampicilina+sulbactam	20µg
<b>β-lactâmico penicilínico semi-sintético</b>	Oxacilina	1µg
<b>β-lactâmicos ceféns cefalosporínicos</b>	Cefalexina	30mcg
	Cefalotina	30µg
<b>β-lactâmicos cefén cefamicínico</b>	Ceftriaxona	30µg
	Cefoxitina	30mcg
<b>β-lactâmicos carbapenêmicos</b>	Imipenem	10mcg
	Meropenem	10µg
<b>Glicopeptídeo:</b> <b>Polipectídeo:</b>	Vancomicina	30µg
	Polimixina B	300µg
<b>Aminoglicosídeos</b>	Gentamicina	10µg
	Estreptomicina	10µg
	Amicacina	30µg
	Neomicina	30µg
	Tobramicina	10µg
<b>Macrolídeos</b>	Eritromicina	15µg
	Azitromicina	15µg
<b>Lincosamina</b>	Clindamicina	2µg
<b>Ansamicina</b>	Rifampicina	5µg
<b>Fenicol</b>	Cloranfenicol	30µg
	Enrofloxacina	5µg
	Norfloxacina	10µg
	Ciprofloxacina	5µg
<b>Fluoroquinolona</b>	Levofloxacina	5µg
	Tetraciclina	30µg
<b>Tetraciclinas</b>	Doxiciclina	30µg
<b>Inibidor do PABA</b>	Sulfazotrim	25µg

**Detecção de isolados multirresistentes:** O índice MAR (múltipla resistência antimicrobiana), calculado pelo número de antimicrobianos resistentes dividido pelo número de antimicrobianos testados, foi avaliado segundo Krumperman (1983). Outro índice avaliado, foi o índice MCAR (resistência multiclasses), foi calculado pela razão entre o número de classes consideradas resistentes (pelo menos uma das drogas resistente) e o número total de classes testadas. Foram consideradas multirresistentes as estirpes que mostraram fenótipo resistente a pelo menos três classes antimicrobianas testadas, ou MCAR maior ou igual a 0,25, segundo Ngoi & Thong (2013).

A detecção fenotípica de isolados multirresistentes de importância em saúde pública foi realizada por disco-difusão utilizando os seguintes antimicrobianos: para MRS (*Staphylococcus* spp. metilina resistente), oxacilina e cefoxitina, segundo CLSI (2008) e CLSI (2013); para MRS-MLSb (MRS resistente ao grupo dos Macrolídeos, Lincosaminas e Streptogamina B), eritromicina e clindamicina, segundo Kim et al. (2004); para ESBL (enterobactérias de espectro ampliado a beta-lactamases), com presença de halo fantasma entre amoxicilina+clavulonato e aztreonam, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona e cefepima, segundo Souza Júnior et al. (2004); e para VRE (*Enterococcus* spp. resistente a vancomicina), a vancomicina, segundo CLSI (2008).

**Extração de DNA:** a extração foi realizada de acordo com a metodologia de Doyle e Doyle (1987), onde os isolados previamente identificados como *Staphylococcus* spp. foram plaqueados em ágar Padrão de Contagem (PCA) e incubados a 36°C por 24/48 horas. Em seguida, as colônias foram transferidas para microtubos contendo 200 µL de Tris-EDTA (TE) e centrifugadas a 8000 xG por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em 600 µL de Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) e 40 µL de Clorofórmio/Álcool-Isoamílico (CIA) e posteriormente aquecido em banho-maria a 65°C por 30 minutos para a lise celular. Após o banho-maria, foi adicionado 800 µL de CIA seguido de centrifugação por 10 minutos em temperatura ambiente à 12000 xG. O sobrenadante (aproximadamente 500 µL) foi transferido para outro microtubo contendo 500 µL de isopropanol gelado e esta mistura foi incubada a -20°C overnight. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 13500 xG por 20 minutos a -4°C, sendo o sobrenadante descartado e os microtubos colocados em fluxo laminar para a secagem completa do DNA. Após a secagem, o DNA purificado

foi suspenso em 200 µL de TE e acondicionado em temperatura -20°C até sua utilização.

**Deteção do gene *mecA*:** foi realizada utilizando um par de iniciadores desenhados com auxílio do software Gene Runner (versão 3.0 – Copyright © 1994 Hasting Software, Inc.), sendo ele: *sense* 5' GATGATACCTTCGTTCCAC3' (nt 622-640) e *antisense* 5'GTATGTGCGATTGTATTGC3' (nt 917-935) que amplificam um produto de 314 pares de base. A reação de amplificação seguiu o seguinte programa: 10min a 95 °C, seguidos por 30 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 52 °C e 1min a 72 °C. O programa terminou com uma extensão adicional de 10min a 72 °C. Como controle positivo foi utilizado ATCC 43300 e como controle negativo foi utilizado água ultrapura. Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% após coloração com brometo de etídio.

**Análise estatística:** Os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva para cálculo das frequências absoluta e relativa (PETRIE e WATSON, 2009; SAMPAIO, 2010).

#### 6.4. Resultados e Discussão

Das 26 amostras, 19 (73,1%) foram identificadas como cocos Gram positivos, sendo 94,74% (18/19) de *Staphylococcus* spp. e 5,26% (1/19) de *Enterococcus* spp. Foram isoladas sete (26,9%) bactérias gram negativas, sendo 6 fermentadoras, entre elas 33,33% (2/6) *Pantoea agglomerans*, 33,33% (2/6) *Escherichia coli*, 16,67% (1/6) *Enterobacter* spp. e 16,67% (1/6) *Salmonella* spp. Foi isolada uma gram negativa não fermentadora, identificada como *Pseudomonas* spp., conforme descrita na Tabela 7.

**Tabela 7:** Distribuição em frequência, porcentagem e índice MAR médio encontrados em isolados bacterianos obtidos de animais de companhia com afecções oculares externas do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá.

	Isolado bacteriana	Frequência	Porcentagem	MAR (médio)	Frequência MAR ≥0.2
cocos G <sup>+</sup>	<i>Staphylococcus</i> spp.	18	69,23	0.39	13
	<i>Enterococcus</i> spp.	1	3,85	0.14	0
	<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>73,08</b>	<b>0.26</b>	<b>13</b>
bacilo G <sup>-</sup>	Fermentadores				
	<i>Escherichia coli</i>	2	7,69	0.41	2
	<i>Pantoea agglomerans</i>	2	7,69	0,25	1
	<i>Salmonella</i> spp.	1	3,85	0.30	1

<i>Enterobacter</i> spp.	1	3,85	0.08	0
<b>Total</b>	<b>06</b>	<b>23,08</b>	<b>0.26</b>	<b>04</b>
Não Fermentadores				
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	3,85	0.50	1
<b>Total</b>	<b>01</b>	<b>3,85</b>	<b>0.50</b>	<b>1</b>
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>100</b>	<b>0.34</b>	<b>18</b>

Dos 17 cães avaliados, 16 apresentaram o crescimento de *Staphylococcus* spp. Em 5 (29,41%) amostras foi encontrado crescimento de dois tipos bacterianos, sendo que o *Staphylococcus* spp. estava presente em todos, e um (5,88%) apresentou o crescimento de quatro tipos bacterianos, onde dois deles foram identificados como *Staphylococcus* spp., porém com perfil de resistência distinto, sendo consideradas estirpes diferentes. A amostra felina foi identificada como *Staphylococcus* spp.

Um total de 738 avaliações de drogas antimicrobianas foram realizadas, onde o percentual de drogas consideradas resistentes *in vitro* segundo CLSI (2008) foi de 36,04% (n=266) e com resistência intermediária, 6,77% (n=50), totalizando 42,82% (n=316) das avaliações com resistência parcial ou total.

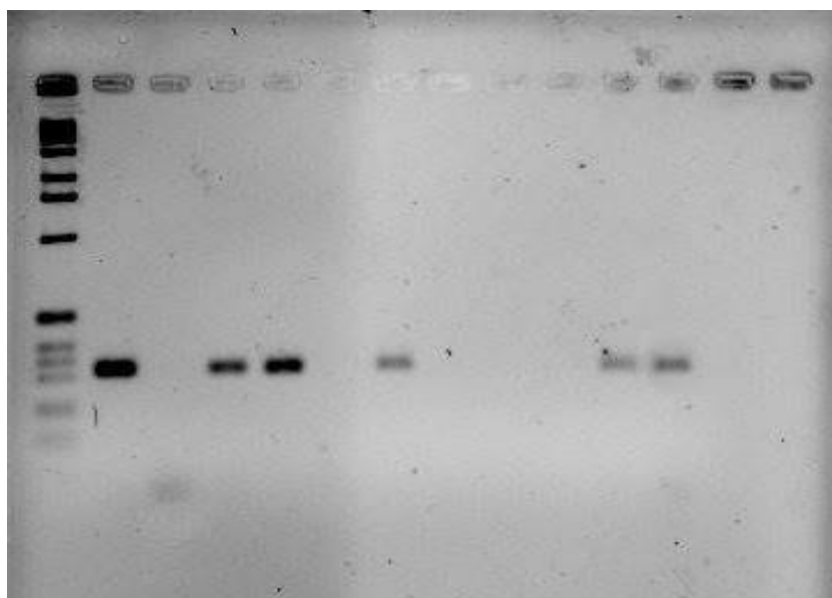
Uma estirpe bacteriana é considerada multirresistente quando, segundo Krumperman (1983), o valor do índice MAR for igual ou superior a 0,2. 18 (69,23%) das 26 amostras obtiveram valores  $\geq 0,2$ , com média total de 0,36. cinco amostras apresentaram MAR superior a 0,56. O valor médio para o índice MAR de todas as amostras foi de 0,36.

Segundo Ngoi & Thong (2013), a resistência a três ou mais classes de antimicrobianos caracteriza estirpes multirresistentes. 20 (76,92%) dos isolados bacterianos estudados apresentaram valores maiores ou igual a 0,25, sendo resistente a três ou mais classes antimicrobianas, com valor médio de 0,47

A detecção fenotípica de MRS mostrou que 61,11% (11/18) dos isolados de *Staphylococcus* spp. apresentou resistência à oxacilina e 50% (9/18) à cefoxitina, sendo que os nove isolados resistentes à cefoxitina foram também resistentes à oxacilina e apenas dois apresentaram resistência somente à oxacilina. Quando realizada a PCR para a detecção do gene *mecA*, 38,89% (7/18) foram positivas (Figura 6), sendo que apenas uma apresentou sensibilidade à cefoxitina e à oxacilina no teste fenotípico, como mostra na Tabela 8.

**Tabela 8:** Amostras de *Staphylococcus* metilicina resistente (MRS) e seus resultados frente aos antimicrobianos oxacilina e cefoxitina, resultado da detecção do gene *mecA* através da PCR e o índice MAR de cada um.

Isolado bacteriano	Oxacilina	Cefoxitina	PCR	MAR
Isolado 1	R	S	Negativo	0,56
Isolado 2	R	R	Positivo	0,79
Isolado 3	R	R	Positivo	0,75
Isolado 4	R	R	Negativo	0,45
Isolado 5	R	R	Positivo	0,5
Isolado 6	R	R	Negativo	0,63
Isolado 7	R	R	Positivo	0,63
Isolado 8	R	R	Positivo	0,33
Isolado 9	R	S	Negativo	0,37
Isolado 10	R	R	Negativo	0,39
Isolado 11	R	R	Positivo	0,43
Isolado 12	S	S	Positivo	0,13
<b>TOTAL</b>	<b>11</b>	<b>09</b>	<b>07</b>	<b>0,50</b>



**Figura 6:** Detecção do gene *mecA* em amostras de *Staphylococcus* spp. isolados de afecções oftálmicas em cães e gatos no hospital veterinário da Universidade Estadual de Maringá, Campus Umuarama. A canaleta 1 indica o marcador, a canaleta de número 2 o controle positivo (ATCC 43300), canaleta 3 o controle negativo, as canaletas 4, 5, 7, 11 e 12 indicam amostras positivas para o gene *mecA*, enquanto as canaletas 6, 8, 9, 10, 13 e 14 amostras negativas.

Em relação ao perfil de resistência encontrado das estirpes bacterianas estudadas, apenas três drogas apresentaram porcentagens acima de 70% de resistência, sendo eles: penicilina (R=84,2%) e ampicilina (R=76%), pertencentes aos beta-lactâmicos penicilínicos e aminopenicilinas respectivamente e a clindamicina (R=80,77%) da classe da lincosamida. Com porcentagem de resistência entre 50 e 70% foram encontradas a tetraciclina (R=69,23%), a

aminopenicilina amoxicilina (R=65,38%), os macrolídeos eritromicina (R=67,9%, testado somente em Gram positivoss) e azitromicina (R=61,54%); o sulfazotrim (R=64%); a rifampicina (R=60%); o beta-lactâmico semissintético oxacilina (R=57,89%), avaliada apenas em Gram positivoss) e a fluorquinolona ciprofloxacina (R=52,17%). As drogas consideradas menos resistentes foram a cefalosporina de 3ª geração: ceftriaxona (R=26,92%); o cloranfenicol (R=19,23%); o aminoglicosídeo amicacina (R=11,54%); os beta-lactâmicos associados a inibidores de betalactamases: sulbactam com ampicilina (R=5%) e clavulanato com amoxicilina (R=15,38%) e os beta-lactâmicos carbapenêmicos: imipenem (R=0%) e meropenem (R=0%); sendo que amostras reportadas com resistência intermediária foram computadas como resistentes para efeitos estatísticos, uma vez que não é aconselhável o seu uso na clínica médica.

Quanto à identificação dos tipos bacterianos envolvidos nas infecções oftálmicas, esse estudo apresentou resultados semelhantes ao encontrados por Oria et al. (2013), onde foram identificados 64,51% das amostras como sendo bactérias gram positivas e 35,48% gram negativas. Quando comparado à identificação do gênero bacteriano, o presente estudo encontrou números semelhantes aos de Zacarias Junior et al. (2012) para isolados de *Staphylococcus* (66%), porém maiores que Oria et al. (2013) que encontraram 38%, no entanto, números semelhantes para *E. coli* e *Enterobacter* spp., 27,27% e 18,18% respectivamente. Assim como Santos et al. (2009), 100% das amostras cultivadas apresentaram pelo menos um tipo de crescimento bacteriano.

O predomínio de amostras gram positivas pode ser explicado pelo fato de que as bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. fazem parte da microbiota residente de mucosa e pele, assim, quando há um desequilíbrio entre o agente e o hospedeiro, esses micro-organismos podem se tornar patogênicos. Esse fato já foi descrito também por Prado et al. (2005) e Wang et al. (2008). Quanto às bactérias gram negativas, principalmente as enterobactérias, elas são consideradas agentes oportunistas nas maiorias das infecções (QUINN et al., 2005), assim, o isolamento desse tipo bacteriano nesse estudo, principalmente de bactérias que não são comumente associadas a infecções oculares, como a *Salmonella* spp. e a *Pantoea agglomerans*, pode ser sugerido pela contaminação ambiental e/ou por má condições de higiene.

Mota et al. (2005) e Arias e Carrilho (2012) relatam um aumento gradativo de multirresistência a antimicrobianos na Medicina Veterinária, fato esse comprovado nesse estudo, onde 69,23% (18/26) apresentaram índice MAR  $\geq 0,2$ , valores esses que variaram de 0,3 a 0,79 (média de 0,47), semelhante ao encontrado por Bordin et al., (2014) que obtiveram um índice MAR médio de 0,48 em amostras de feridas de pequenos animais. Com o aumento no número de drogas testadas, este índice tende a apresentar valores menores, porém com maior confiabilidade, como ocorrido no presente trabalho que avaliou uma média de 28 antimicrobianos por amostras, sendo testado pelo menos um antimicrobiano de 12 classes de drogas.

Das 20 amostras que apresentaram MCAR maiores que 0,25, seis foram Gram negativos, sendo que apenas a amostra de *Enterobacter* sp. não foi considerada multirresistente. Quanto aos *Staphylococcus* sp., dos 18 isolados, 14 (77,78%) apresentaram MCAR maiores que 0,25, dos quais seis foram positivos para presença do gene *mecA*, resultados parecidos com encontrados por Sfaciotte et al., (2014) que encontraram 70% de isolados Gram negativos multirresistentes e 75% dos Gram positivos. O alto índice de multirresistência encontrado no presente trabalho pode ser explicado pelo fato dos micro-organismos possuírem material genético extracromossômico, os plasmídeos, com capacidade de disseminar genes de resistência de forma horizontal, podendo um mesmo isolado ser resistente a várias drogas de diferentes classes (NARVAEZ et al., 2005)

Quando se fala em infecções oftálmicas externas, os principais antimicrobianos utilizados na clínica veterinária são os aminoglicosídeos tobramicina e gentamicina, o cloranfenicol e, em alguns casos, a tetraciclina (BEDFORD e JONES, 2001). O presente estudo mostrou boa susceptibilidade para a tobramicina (74,08%), sendo que apenas cinco (todas elas isolados de *Staphylococcus* spp.) mostraram-se resistente a esse antimicrobiano, o que não foi evidenciado por Subtil (2010), que encontrou altas taxas de resistência, porém valores estes parecidos com Zacarias Junior (2012), que observaram 78,26% de susceptibilidade. A gentamicina também apresentou uma baixa resistência, 30,77% (8/26), das quais sete (87,5%) foram *Staphylococcus* spp. (quatro delas as mesmas que apresentaram resistência à tobramicina) e um *Pseudomonas* spp., dados esses que estão de acordo com os encontrados na literatura (BEDFORT e JONES, 2001; CRISPIN, 2005) e um pouco maior se comparado com Zacarias Junior (2012) que encontrou uma resistência de



apenas 19,56%, onde nenhuma amostra gram negativa apresentou resistência a esse antimicrobiano.

As amostras apresentaram baixa resistência ao cloranfenicol, 19,23% (5/26), onde apenas uma amostra gram-negativa, a *Pseudomonas* spp, mostrou-se resistente, e quatro *Staphylococcus* spp. (todos fenotipicamente identificados como MRS e apenas um com a presença do gene *mecA*). Essa boa susceptibilidade vai de acordo com Subtil (2010).

Quando testada a tetraciclina, mais da metade dos isolados mostraram-se resistentes, 69,23% (18/26), sendo 72,2% (13/18) da resistência encontrada em *Staphylococcus* spp., além da resistência dos isolados de *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas* spp., valores esses próximos aos relatados por Subtil (2010) em Portugal e menores do que encontrados por Zacarias Junior et al. (2012), 80,43%. Das amostras identificadas fenotipicamente como MRS, 90,91% (10/11) apresentaram resistência à tetraciclina e quando identificado o gene *mecA*, todas (7/7) mostraram-se resistentes à tetraciclina.

A fluoroquinolona é a única classe de antimicrobiano que age diretamente no DNA bacteriano, especificamente nas enzimas topoisomerase IV e DNA girase (BLONDEAU, 2004) e sua resistência deve ser reportada em conjunto, assim como preconiza o CLSI (2008), onde a resistência a uma droga implica a resistência a toda a classe. No presente estudo foram utilizados quatro antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, sendo três deles considerados de 2º geração (norfloxacina, enrofloxacina e ciprofloxacina) e um da 3º geração (levofloxacina), com percentuais de resistência de 46,15% para enrofloxacina, 36% para norfloxacina, 52,17% para ciprofloxacina e 34,62% para levofloxacina, valores esses acima dos encontrados por Zacarias Junior et al. (2012) para ciprofloxacina (25%) e norfloxacina (20,8%). Em isolados MRS, a resistência às fluoroquinolonas é relativamente comum (MARANGON et al., 2004), sendo que nesse estudo, dos 11 MRSs identificados fenotipicamente, nove (81,81%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos da classe das fluorquinolonas, resultados esses semelhantes aos de Asbell et al. (2008), que encontraram uma resistência de 84,8% para ciprofloxacina e 78,8% para levofloxacina em amostras humanas, enquanto que nas amostras onde foi detectado o gene *mecA*, apenas uma amostra (sensível à oxacilina e cefoxitina) foi sensível a todos os antimicrobianos da classe. Já as gram negativas, 42,85% (3/7) mostraram resistência à classe (os dois isolados de *E. coli* e um isolado de

*Pantoea agglomerans*), porém, segundo Zacarias Junior et al. (2012), há uma deficiência nos estudos de sensibilidade a antimicrobianos em isolados de micro-organismos Gram negativos de afecções oftálmicas externas em cães.

O sulfazotrim foi o antimicrobiano testado da classe das sulfonamidas, sendo encontrada uma sensibilidade mediana para gram negativas (46%) e baixa para gram positivas (29,4%), assim como Zacarias Junior et al., (2012) em seus estudos, porém Cruz et al. (2012), encontraram uma sensibilidade de 65% em isolados Gram negativos. A rifampicina nesse estudo apresentou resistência de 100% para os isolados Gram negativos e 80% de resistência em MRS. Resultados esses confirmam o fato de que a sensibilidade antimicrobiana depende da realidade de cada local, tornando uma ferramenta essencial para identificação de isolados multirresistentes.

Apesar de possuírem fórmulas diferentes, os antimicrobianos das classes dos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B apresentam o mesmo mecanismo de ação frente aos micro-organismos, inibindo a síntese proteica através da ligação ao receptor 23s do rRNA que faz parte da subunidade 50s do ribossomo bacteriano, formando grupo MLSb. Epidemiologicamente, a resistência cruzada entre essas três classes de antimicrobianos é muito importante (Dipersio & Dipersio, 2005), uma vez que são amplamente utilizados na medicina veterinária levando ao aumento de resistência de origem animal.

A clindamicina, representante da classe lincosamida, é muito utilizada na medicina veterinária, apresentando como indicação as infecções causadas por *Staphylococcus*, principalmente os MRS (FIEBELKORN et al., 2003). No presente estudo, a clindamicina apresentou uma resistência de 80,77% (77,7% em gram positivas e 100% em gram negativas), valores que corroboram com os obtidos por Bordin et al. (2014), Ishii et al. (2011) e Santos (2011), indicando que a droga não deve ser utilizada na terapia antimicrobiana empírica na atualidade. Outro fato que corrobora com a não utilização dessa droga se dá pela resistência de 100% encontrada no presente estudo para amostras fenotipicamente MRS, assim como as amostras onde foram detectado o gene *mecA*, sendo que Kim et al. (2004) também encontraram uma resistência de 97% a pelo menos um antimicrobiano do grupo MSLb em MRSA. Quanto aos macrolídeos, o presente estudo demonstrou uma resistência de 57,9% para eritromicina (testado somente em Gram positivos) e 61,54% para azitromicina (50% para Gram positivos e 100% para Gram negativos),

resistência essa acima da encontrada por Pereira et al. (2009) para azitromicina, 47,3% e por Bordin et al. (2014), 42%, porém, assim como Pereira et al. (2009), houve uma maior resistência em amostras gram negativas. Dentre os MRS, apenas 25% (3/12) apresentaram sensibilidade à azitromicina e 16,66% à eritromicina, tornando assim, os macrolídeos junto com a lincosamida, classes de antimicrobianos não recomendados para prática terapêutica do hospital veterinário devido aos testes de susceptibilidade.

Além da gentamicina e da tobramicina, outros três antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos foram testados: a neomicina, com 48% de resistência (47,06% em Gram positivos e 42,86% em Gram negativos); a estreptomicina, com 41,67% (43,75% em Gram positivos e 42,86 em Gram negativos); e a amicacina, com 11,54% (15,79% em Gram positivos e nenhuma resistência em Gram negativos). Ishi et al. (2011) detectaram resistência à neomicina em 65,4%, valores acima do presente estudo, enquanto Bordin et al. (2014) relataram resistência em 47% frente à estreptomicina e 21% frente à amicacina, ambos os estudos foram realizados com amostras de feridas. Zacarias Junior et al. (2012) encontraram uma resistência de 26,08% em relação a neomicina para isolados de cães com afecções oculares externas na região de Bandeirantes no Paraná, valores abaixo dos encontrados no presente estudo. Porém Santos (2011) encontrou uma susceptibilidade à amicacina próxima à encontrada no presente estudo, 86,7%, sendo que os três isolados resistentes à amicacina foram de isolados fenotipicamente identificados como MRS, dando um percentual de 27,27% (3/11) de resistência frente a esses micro-organismos. Zacarias Junior et al. (2012), encontraram uma resistência acima do presente estudo, 39,13% o que evidencia ainda mais o fato de que a susceptibilidade microbiana depende de cada região, uma vez que no presente estudo realizado também no Paraná, porém região diferente, mostrou padrões de resistência distintos.

A oxacilina é uma droga semissintética da classe dos beta-lactâmicos e, segundo o CLSI (2008), é a droga para a predição de resistência a todos os beta lactâmicos em *Staphylococcus* spp., associado também a resistência à cefoxitina. Segundo Kim et al. (2012) e Cartwright et al. (2013), quando uma amostra apresenta resistência fenotípica à oxacilina e à cefoxitina, indica a presença do gene *mecA*, já quando há sensibilidade à oxacilina, porém resistência à cefoxitina, indica a presença do gene *mecC*, ambos responsáveis pela produção de uma proteína

ligadora de penicilina adicional (PBP2a) que confere baixa afinidade de ligação às drogas beta-lactâmicas. *Staphylococcus* spp. portadores destes genes são chamados de MRS. Nesse estudo, das 18 amostras de *Staphylococcus* spp. 11 apresentaram resistência à oxacilina e nove à cefoxitina, demonstrando a presença fenotípica de MRS em 61,11% (11/18) das amostras, sendo que nenhuma demonstrou predição para o gene *mecC*. Dessas 11 amostras, 54,54% (6/11) apresentaram resultados positivos na detecção do gene *mecA* na reação de PCR e uma amostra que apresentou sensibilidade para os dois antimicrobianos apresentou reação positiva na PCR, assim, 38,89% (7/18) foram confirmadas como sendo isolados MRS, sendo esses valores um pouco maiores dos encontrados por Pereira et al. (2009) que também relataram a detecção de MRS, através da resistência à oxacilina e detecção do gene *mecA* em 15% das amostras de *Staphylococcus* obtidas de lesões de cães e gatos.

Os antibióticos penicilina (beta-lactâmico penicilínico) e ampicilina (aminopenilínico) apresentaram os maiores índices de resistência, 84,21% (testado somente em Gram positivoss) e 76% (82,35% em Gram positivoss e 71,43% em Gram negativos) respectivamente. Já Zacarias Junior et al. (2012) encontraram uma maior resistência à ampicilina em isolados Gram negativos, 100% (8/8) enquanto que em Gram positivoss a resistência foi de 62,16%. Outro aminopenicilínico testado foi a amoxicilina que apresentou 65,38% de resistência, valor esse não muito aquém do encontrado por Bordin et al. (2014) e Ishii et al. (2011). Quando associados aos inibidores de beta-lactamase, a ampicilina com sulbactam e a amoxicilina com ácido clavulônico apresentaram uma melhora na susceptibilidade, apresentando índices de resistência de 5% e 15,38% respectivamente, aumentando a sensibilidade em 71% para ampicilina e 40% para amoxacilina. Assim como Bordin et al. (2014) que compararam o uso de aminopenicilínicos isolados e sua associação com inibidores de beta-lactamase e demonstraram melhora na associação, o presente estudo também detectou esse aumento na sensibilidade.

A cefalosporina é outro grupo de antimicrobianos pertencentes à classe dos beta-lactâmicos, sendo testadas as cefalosporinas de 1º geração cefalexina e cefalotina e a cefalosporinas de 3º geração ceftriaxona. A cefalexina apresentou uma resistência de 34,61% (31,58% em Gram positivoss e 42,86% em Gram negativos), resultado parecido com a cefalotina, 38,46% (26,32% em Gram positivoss e 71,4% em Gram negativos), já a ceftriaxona apresentou menor

resistência, com 26,92% (26,32% em Gram positivos e 28,6% em Gram negativos). Zacarias Junior et al. (2012) encontraram resistência a cefalexina de 50%, valor acima do presente trabalho, já para ceftriaxona a resistência foi ainda maior, 58,7%. A resistência frente aos *Staphylococcus* spp. da classe só foi observada em amostras consideradas MRS (6/12), sendo assim, associando esses dados com a resistência a oxacilina e as informações preconizadas pelo CLSI (2008), essa classe de antimicrobianos não é indicada para MRS, porém, em amostras oftálmicas MSS, o uso desse grupo é indicado, diferentemente do observado por Bordin et al. (2014) que não aconselha o uso dessa classe em animais que apresentam feridas, assim como Arias et al. (2008).

Os carbapenêmicos, outro grupo dos beta-lactâmicos, possuem uma afinidade maior as PBPs do que as penicilinas, o que lhes confere uma maior potência e um espectro antibacteriano maior (POSSEBON e CAMARGO, 2003). Na medicina veterinária o uso desse grupo de antimicrobiano não é muito difundido. Em *Staphylococcus*, a resistência a esse grupo é semelhante à encontrada nos outros antimicrobianos da classe, onde a resistência à oxacilina/cefotaxima já é indicativa para todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, porém, em enterobactérias, a sua resistência é um grave problema de saúde pública de âmbito mundial, uma vez que um isolado resistente aos carbapenêmicos não possui muitas opções terapêuticas para tratamento. A disseminação ao redor do mundo de isolados com beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) tornou os carbapenêmicos os antimicrobianos de primeira escolha para esse tipo de micro-organismo multirresistente, porém em 2005 no Brasil, foi relatado o primeiro caso de infecção fatal de *Klebsiella pneumoniae* resistente a eles (RIBEIRO, 2013).

No presente estudo, foram detectadas duas amostras de ESBL, um isolado de *Pantoea agglomerans* (MAR=0,44) e outro de *Pseudomonas* spp. (MAR=0,5), sendo que as duas amostras apresentaram-se sensíveis aos carbapenêmicos testados (meropenem e imipenem). Nenhum isolado avaliado apresentou resistência ao meropenem ou ao imipenem, porém, em isolados Gram positivos, 63,16% (12/19) não é indicado o uso da classe, devido a resistência à oxacilina em 11 amostras (6 apresentando também o gene de resistência) e a detecção do gene *mecA* em uma amostra sensível à oxacilina. O uso dos carbapenêmicos na medicina veterinária, assim como dito por Bordin et al. (2014), deve ser feito com muito cuidado para evitar a pressão de seleção de clones resistentes e impedir a

transmissão de resistência a outras estirpes bacterianas, uma vez que já existem relatos de resistência bacteriana de isolados animal passarem resistência para isolados humanos e vice-versa.

Após a descoberta de bactérias gram positivas multirresistentes, principalmente os MRS, os antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina, tem sido, por muitos anos, a última alternativa para o tratamento contra estes micro-organismos na medicina. Porém, em 1997, no Japão, foi reportada a primeira estirpe de *Staphylococcus aureus* com sensibilidade reduzida a vancomicina (VISA) (HIRAMATSU et al., 1997) e já em 2002, de uma estirpe resistente (VRSA) a qual possuía um gene de resistência pertencente ao *Enterococcus faecalis*, o gene *vanA* (SOUSA, 2006), o que pode ser explicado pela transferência conjugativa desse gene entre *Enterococcus* e *Staphylococcus* (WEESE, 2005). De acordo com o CLSI (2008), para a detecção de isolados VISA e VRSA deve-se realizar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou o teste em ágar Screen para vancomicina, porém, isolados resistentes à vancomicina pelo teste de disco-difusão devem ser reavaliados por CIM.

Das 18 amostras de *Staphylococcus*, 13 (72,23%) apresentaram sensibilidade à vancomicina no teste de disco-difusão, em cinco (27,77%), é necessária a realização do teste CIM para correta avaliação. Até então não foi relatada nenhuma amostra VISA ou VRSA na medicina veterinária, devido ao pouco uso e a quantidade escassa de estudo frente à resistência aos glicopeptídeos (MONCHIQUE, 2013; SFACIOTTE et al., 2014). Quanto ao isolado de *Enterococcus*, a amostra revelou-se sensível ao teste de disco-difusão com a vancomicina. Com o aparecimento de isolados de *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), esse grupo de micro-organismo se tornou uma das bactérias mais importantes clinicamente resistentes em todo o mundo, pois são poucos os agentes terapêuticos capazes de tratar infecções causadas por esse grupo.

## 6.5. Conclusão

Os principais micro-organismos encontrados em infecções oftálmicas externas em cães foram os Gram positivos, principalmente os pertencentes ao gênero dos *Staphylococcus*, sendo também reportados isolados Gram negativos, fermentadores e não fermentadores, mas com menor frequência. Assim como na

medicina humana, a resistência frente aos antimicrobianos, tanto para bactérias gram positivas como para gram negativas, vem crescendo gradativamente não importando o sistema envolvido. Esse aumento de resistência encontrada ocorre devido à grande pressão seletiva ocasionada pelo uso indiscriminado dos antimicrobianos, principalmente na medicina veterinária, uma vez que o controle da venda desses medicamentos não é realizado.

No atual estudo foram detectados isolados multirresistentes de grande importância e que estão envolvidas em casos de saúde pública, como MRS, MRS-MLSb, ESBL, sendo muito importante a sua rápida identificação e controle para evitar assim a disseminação desse tipo de resistência. Apesar de não ter sido isolado estirpes VRE, não se pode ignorar a sua grande importância, principalmente em infecções hospitalares humanas. Assim, recomenda-se o uso criterioso destas drogas, sempre associando a testes *in vitro*, para avaliação da melhor terapia a ser utilizada, diminuindo o uso demasiado de antimicrobianos e reduzindo taxas de resistência a determinadas drogas já muito resistentes, evitando-se a resistência a drogas ainda suscetíveis.

Levando-se em conta os isolados multirresistentes, os principais micro-organismos isolados e o perfil de resistência encontrado nesse estudo, as principais classes de antimicrobianos indicadas para o tratamento de afecções oftálmicas externas que acometem os animais da clínica médica de pequenos animais do hospital veterinário em questão, são as classes dos aminoglicosídeos e o cloranfenicol, podendo ser utilizado, mas com um pouco mais de cautela, a classe das fluoroquinolonas.

O perfil de resistência bacteriana varia ao longo dos anos e difere de região para região, assim, o seu monitoramento deve ser constante e não deve ser ignorado por profissionais veterinários tanto clínicos como cirurgiões. A escolha prudente da terapia antimicrobiana adotada reduz o uso de antimicrobianos e consequentemente o desenvolvimento de resistência bacteriana pela seleção, principalmente em ambientes hospitalares.

## **6.6. Referências**

ALMEIDA, NETO, J.B., SÁ, F. B.; SILVA, K.P.C.; BUZINHANI, M. Flora conjuntival bacteriana de ovinos sadios da raça Sta Inês e seus mestiços criados na microrregião de Garanhuns, PE. **Ciencia Vet Trop**, v.9, n.1, p.17–22, 2006.

ANDRADE, A.L., STRINGHINI, G., BONELLO, F.L., MARINHO, M., PERRI S.H.V. Microbiota conjuntival de cães sadios da cidade de Araçatuba, São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**. v.65, p.323-326, 2002.

ANDREW, S.E.; NGUYEN, A.; JONES, G.L.; BROOKS, D.E. Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. **Vet Ophthalmol**, v.6, n.1, p.45–50, 2003.

ANVISA. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde – Módulo 6: detecção e identificação e bactérias de importância médica. 2ª Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília: ANVISA, 2013.

ORIA, A.P., PINNA, M.H., FURTADO, M.A., PINHEIRO, A.C.O., GOMES JUNIOR, D.C., COSTA NETO, J.M. microbiota conjuntival em cães clinicamente sadios e cães com ceratoconjuntivite seca. **Cienc. anim. bras., Goiânia**, v.14, n.4, p. 495-500, 2013.

ARIAS, M.V.B. e CARRILHO, C.M.D.M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.775-790, 2012.

ARIAS, M.V.B.; BATAGLIA, L.A.; AIELLO, G.; CARVALHO T.T; FREITAS, J.C. Identificação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de cães e gatos com feridas traumáticas contaminadas e infectadas. **Semina**, v.29, p.861-874, 2008.

ARMSTRONG, R. A. The microbiology of the eye. *Ophthalmic Physiological Optics*, v.20, n.6, p.429-441, 2000.

ASBELL, P.A., SAHM, D.F., SHAW, M., DRAGHI, D.C., BROWN, N,P. Increasing prevalence of methicillin resistance in serious ocular infections caused by *Staphylococcus aureus* in the United States: 2000 to 2005. **J Cataract Refract Surg**, v.34, p.814–818, 2008.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C; TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** v.45, p.493-496, 1966.

BEDFORD, P. G. C. & JONES, R. G. (2001). Abnormal appearance. In R. L. Peiffer e S. M. Peterson-Jones (Eds.), *Small Animal Ophthalmology: a problem-oriented approach*. (3rd ed.). London: W. B. Saunders. pp.77, 78, 83.

BLONDEAU, J.M. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. **Surv Ophthalmol.**, v.49(suppl 2), p.S73–S78, 2004.

BORDIN, J.T.; SFACIOTTE, R.A.P.; CORONEL, L.G.; MENDES, L.M.; VIGNOTO, V.K.C.; DE CONTI, J.B.; WOSIACKI, S.R. Identificação de cepas bacterianas multirresistentes isoladas de feridas de pequenos animais do Hospital Veterinário da UEM. **Pesq. Vet. Bras.** (artigo enviado), 2014.



CARTWRIGHT, E.J.P.; PATERSON, G.K.; RAVEN, K.E.; HARRISON, E.M.; GOULIOURIS, T.; KEARNS, A.; PICHON, B.; EDWARDS, G.; SKOV, R.L.; LARSEN, A.R.; HOLMES, M.A.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S.J.; TOROK, M.E. Use of Vitek 2 antimicrobial susceptibility profile to identify *mecC* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.** v.51, p.2732–2734, 2013.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3rd ed. Approved standard M31-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2013.

CRISPIN, S. M. Notes on veterinary ophthalmology. Índia: Blackwell Publishing. pp. 81,92, 102-104, 119-120, 2005.

CRUZ, A.R., PAES, A.C., SIQUEIRA, A.K. Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.4, p.601-610, 2012

CULLEN, C.L. Normal ocular features, conjunctival microflora and intraocular pressure in the Canadian Beaver (*Castor canadensis*). **Vet Ophthalmol**, v.6, n.4, p.279-284, 2003.

DAVIDSON, H.J., ROGERS, D.P., YEARY, T.J. Conjunctival microbial flora of clinically normal pigs. **Am J Vet Res**, v.55: p.949–951, 1994.

DEVRIESE, L .A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M. VANEECHOUTTE, M. GRAEF,E.; SANUWAERT, C.; et al. *Staphylococcus intermedius* sp. nov., a coagulase positive species from animals. **Int J Syst Environ Microbiol**, v.55, n.4, p.1569-1573, 2005.

DIPERSIO, J.R. e DIPERSIO, L.P. Update on the prevalence and spread of macrolide and lincosamide-resistant staphylococcal and streptococcal species. **Rev. Med. Microbiol.** v.16, p.117–123, 2005.

DOYLE,J.J.; DOYLE, J.L.; HORTORIUM, L.H.B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1987.

FIEBELKORN, K.R., CRAWFORD, S.A., MCELMEEL, M.L. JORGENSEN, J.H. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology** v.41, p.4740-4744, 2003

FREDRICKSON, AG. Behavior of mixed cultures of microorganisms. **Ann Rev Microbiol**, v.31, p.63-87, 1977.

GIGUÉRE, S., e WALKER, R. D. Principles of antimicrobial drug selections and use. In S.Giguère, Prescott, Baggot, R. D. Walker & Dowling (eds.) Antimicrobial therapy in veterinary medicine (4th Ed). pp.110, 111, 2006.

GRAHAM, J. E.; MOORE, J. E.; JIRU, X.; MOORE, J.E.; GOODALL, E. A.; DOOLEY J. S. G.; HAYES, V. E. A.; DARTT, D. A.; DOWNES, C. S.; MOORE, T. C. B. Ocular pathogen or commensal: A PCR-based study of surface bacterial flora in normal and dry eyes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, n. 12, 2007.

HERITAGE, J.; EVANS, E.G.V.; KETTINGTON, R.A. The human commensal flora. In: *Microbiology in Action*. Cambridge University Press, Cap 6., 121-130, 2003.

HIRAMATSU, K., HANAKI, H., INO, T., YABUTA, K., OGURI, T., TENOVER F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J Antimicrob Chemother**, v.40, p.135–136, 1997.

HSU, C.; WISEMAN, G.M. Antibacterial substances from staphylococci. **Can J Microbiol**, v.13, p.947-955, 1967.

ISENBERG, S.J.; APT, L.; YOSHIMORI, R.; ALVAREZ, S.R.. Bacterial flora of the conjunctiva at birth. **J Ped Ophthalmol & Strabismus**, v.23, p.284-286, 1994.

ISHII, J.B., FREITAS, J.C., ARIAS, M.V.B. Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina(2008-2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31, n.6, p.533-537, 2011.

JONES, R.D., KANIA, S.A., ROHRBACH, B.W., FRANK, L.A., BEMIS, D.A. Prevalence of oxacillin- and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1,772 samples (2001-2005). **J Am Vet Med Assoc.**, v.230, n.2, p.221-227, 2007.

KIM, C., MILHEIRIÇO, C., GARDETE, S., HOLMES, M.A., HOLDEN, M.T.G., LENCASTRE, H., TOMASZ, A. Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the betalactam-resistant phenotype. **J. Biol. Chem.**, v.287, p.36854–36863, 2012.

KIM, H.B., LEE, B., JANG, H.C., KIM, S.H., KANG, C.I., CHOI, Y.J., PARK, S.W., KIM, B.S., KIM, E.C., OH, M.D., CHOE, K.W. A high frequency of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance determinants in *Staphylococcus aureus* isolated in South Korea. **Microb Drug Resist.** v.10, n.3, p.248-254, 2004.

KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk source of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, v.46, n.1, p.165-170, 1983.

KUDIRKIENE, E.; ZILINSKAS, H.; SIUGZDAITE, J. Microbial flora of the dog eyes. **Veterinarija Ir Zootechnika**, v. 34, n. 56, p. 18-21, 2006.

LLOYD, D. H. Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. **Clinical Infectious Disease**, v.2, p.S148–S152, 2007.

SANTOS, L.G.F., ALMEIDA, A.B.P.F., SILVA, M.C., OLIVEIRA, J.T., DUTRA, V., SOUSA, V.R.F. Microbiota conjuntival de cães hígidos e com afecções oftálmicas. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.37, n.2, p.165-169, 2009.

MARANGON, F.B., MILLER, D., MUALLEM, M.S., ROMANO, A.C., ALFONSON, E.C. Ciprofloxacin and levofloxacin resistance among methicillinsensitive *Staphylococcus aureus* isolates from keratitis and conjunctivitis. **Am J Ophthalmol.**, v.137, p.453–458, 2004.

MOELLER, C. T. A.; BRANCA, B. C.; YU, M. C. Z.; FARAH, M. E.; SANTOS, M. A. A.; HÖFLING-LIMA, A. L. Evaluation of normal ocular bacterial flora with two different culture media. **Canine Journal Ophthalmology**, v.40, n.4, 2005.

MONCHIQUE, C.R.O. 2013. Evolução da resistência aos antibióticos em *Staphylococcus* spp. –1999 a 2006. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal. 67f.

MONTIANI-FERREIRA, F., WARTH, J.F., PACHALY, J.R., REIFUR, L., DOTTI, C.F. Contribuição ao estudo da ação da meropenema, *in vitro* e *in vivo*, em infecções diagnosticadas em pequenos animais. **Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR** v.2, p.2, 1999.

MONTIANI-FERREIRA, F., MATTOS, B.C.; RUSS, H. H.A. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the ferret (*Mustela putorius furo*). **Vet Ophthalmol.**, v.9, n.4, p.209-213, 2006.

MONTIANI-FERREIRA, F., SHAW, G., MATTOS, B.C.; RUSS, H. H.A., VILANI, R.G D'O.C. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests of the capuchin monkey (*Cebus apella*) **Vet Ophthalmol.**, v.11, n.3, p.197-201, 2008b.

MONTIANI-FERREIRA, F., TRUPPEL, J.; TRAMONTIM, M. H.; VILANI, R.G; LANGE, R.R. The capybara eyes: clinical tests, anatomic and biometric features. **Vet Ophthalmol.**, v.11, n.6, p.386-394, 2008.

MOTA, R.A.; FRETIAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.42, n.6, p.465-470, 2005.

NGOI, S.T., THONG, K.L. Molecular characterization showed limited genetic diversity among *Salmonella Enteritidis* isolated from humans and animals in Malaysia. **Diag. Microbiol. Infec. Disease**, v.77, p.304-311, 2013.

ORIA, A.P., PINHEIRO, A.C.O., ALMEIDA, D.S., FURTADO, M.A., PINNA, M.H. Microbiota normal bacteriana da conjuntiva ocular – Revisão de literatura. **Revista Medicina Veterinária, Recife**, v.5, n.3, p.16-21, 2011.

PEREIRA, I.A., SOARES, L.C., COELHO, S.M.O., PRIBUL, B.R. SOUZA, M.M.S. Susceptibilidade á azitromicina de isolados bacterianos de processos infecciosos em cães e gatos. **Pesquisa veterinária Brasileira**. v.29, n.2, p.153-156, 2009.

PETRIE, A. e WATSON P. Estatística em Ciência Animal e Veterinária. 2ed. São Paulo: Editora Roca. 248p., 2009.

POSSEBON, M.I. e CAMARGO, E.A. Resistência bacteriana aos carbapenêmicos. **RBM rev. bras. Med.** v.60, n.6, p.378-378, 2003.

PRADO, M. R.; BRITO, E. H. S.; GIRÃO, M. D.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Identification and antimicrobial susceptibility of bacterial isolated from corneal ulcers of dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p.33-37, 2006.

PRADO, M. R.; ROCHA, M. F. G.; BRITO, E. H. S.; GIRÃO, M. D.; MONTEIRO, A. J.; TEIXEIRA, M. F. S. Survey of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.1, p.33-37, 2005.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D.A. Microbiology Fifth Edition. The Macgraw-Hill Companies, 2002, p.2.

QUINN, P. J. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RIBEIRO, V.B. Detecção de resistência aos carbapenêmicos e avaliação da produção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (kpc) em isolados clínicos da família *Enterobacteriaceae*. Tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 134f, 2013.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 3ed. FEPMVZ-Editora, Belo Horizonte. 221p., 2010.

SANTOS, L. L. CARACTERÍSTICAS DA MICROBIOTA DA SUPERFÍCIE OCULAR BACTERIANA EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES. 2011. 76 f. Dissertação - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curitiba, 2011.

SHIMAMURA, G. M. Estudo da microbiota conjuntival de cães portadores de Diabetes mellitus. 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008

SLATTER, Fundamentals of veterinary ophthalmology. 3a ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 640 p., 2001

SOLARI, H. P., SOUSA, L. B., FREITAS, D., YU, M. C. Z., HÖFLING-LIMA, A. L. Características laboratoriais das ceratites e conjuntivites causadas por *Streptococcus* sp. **Arq Bras Oftalmol.**, v.67, n.5, p.781-784, 2004.

SOUSA JUNIOR, M.A., FERREIRA, E.V., CONCEIÇÃO G.C. Betalactamase de Espectro Estendido (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab**, v.63, p.152-174, 2004.

SOUSA, J. C. 2006. Manual de antibióticos antibacterianos (2ª edição). Porto, Ed. Universidade Fernando Pessoa.

SPINELLI, T.P.; OLIVEIRA-FILHO, E.F.; SILVA, D.; MOTA, R.; SÁ, F.B. Normal aerobic bacterial conjunctival flora in the crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*) and coati (*Nasua nasua*) housed in captivity in Pernambuco and Paraíba (Northeast, Brazil). **Vet Ophthalmol.**, v.13 (Sup.1), p.134-136, 2010.

SUBTIL, S. D. O. Bacteriologia ocular em canídeos -- estudo retrospectivo 2002-2010. 2010. 70 f. Dissertação – Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa, 2010.

SWINGER, R. L.; LANGAN, J. N.; HAMOR, R. Ocular bacterial flora, tear production and intraocular pressure in a captive flock of Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.40, n. 3, p. 430-436, 2009.

TARABISHY AB, JENG BH. Bacterial conjunctivitis: a review for internists. **Cleve Clin J Med.**, v.75, p.507-512, 2008.

TOLAR, E. L.; HENDRIX; D. V. H.; ROHRBACH, B. W.; PLUMMER, C. E.; BROOKS, D. E.; GELATT, K. N. Evaluation of clinical characteristics and bacterial isolates in dog with bacterial keratitis: 97 cases (1993-2003). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.228, n.1, p.80-85, 2006.

UESUGUI, E; CYPEL-GOMES, M.C.; ATIQUE, D.; GOULART, D.G.; GALLUCCI, F.R.; NISHIWAKI-DANTAS et al. Identificação laboratorial dos patógenos oculares mais frequentes e sua suscetibilidade *in vitro* aos agentes antimicrobianos. **Arq. Bras. Oftalmol.**; v.65, n.3, p.339-342, 2002.

VARGES, R., PENNA, B., MARTINS, G., MARTINS, R., LILENBAUM, W. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* isolated from naturally occurring canine external ocular diseases. **Vet Ophthalmol.**, v.12, n.4, p.216-220, 2009.

WANG, L.; PAN, Q.; ZHANG, L.; XUE, Q.; CUI, J.; QI, C. Investigation of bacterial microorganisms in the conjunctival sac of clinically normal dogs and dogs with ulcerative keratitis in Beijing, China. **Veterinary Ophthalmology**, v.11, n.3, p.145-149, 2008.

WEESE, J. S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen in small animals. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.41, p.150-157, 2005

WHITLEY, R. D. Canine and feline primary bacterial infection. **Veterinary Clinics of North America**, v.30, n.5, p.1151-1167, 2000.

WILSON, M. Eye and Its Indigenous Microbiota. In: Microbial Inhabitants of Humans – Their Ecology and Role in Health and Disease. Cambridge University Press, 2005. Cap 3, p107- 126.

ZACARIAS JUNIOR, A., FREITAS, J. C., ZACARIAS, F. G. S., SALVADOR, R., GARCIA, J. L. Investigation of bacterial microbiota and risk factors in dogs with external ocular diseases from Bandeirantes, Paraná State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v.33, suplemento 2, p.3243-3250, 2012.

## 7. CAPÍTULO 4 – DETECÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS MRS MULTIRRESISTENTES ISOLADOS DE PEQUENOS ANIMAIS

### 7.1. RESUMO

Nas últimas décadas, tem-se observado a emergência de microrganismos resistentes aos antibióticos, dentre os quais se destaca o *Staphylococcus* spp. resistente à metilicina (MRS). Um dos principais mecanismos de resistência dos *Staphylococcus* é codificada pelo gene *mecA*, responsável pela produção de uma proteína ligadora de penicilina adicional (PBP 2a), que possui uma baixa afinidade pelos agentes beta-lactâmicos. A análise da presença deste gene serve como indicativo e auxilia na escolha da melhor terapia antimicrobiana. O objetivo deste trabalho foi detectar de forma fenotípica e genotípica estirpes de MRS e avaliar o perfil de resistência antimicrobiana destes isolados. 80 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos, identificados como *S. pseudointermedius*, foram avaliados pela disco-difusão com oxacilina e cefoxitina e amplificação por PCR de um fragmento do gene *mecA*, para caracterização de estirpes de MRS. 2285 avaliações de drogas antimicrobianas foram realizadas, onde 931 (40,74%) dos teste apresentaram resistência parcial ou total. Na detecção fenotípica de MRS, 58,75% (47/80) dos isolados apresentaram resistência à oxacilina e 53,75% (43/80) à cefoxitina. Na detecção genotípica, o gene *mecA* foi encontrado em 23 (28,75%) dos isolados. Avaliando-se a os isolados MRS e MSS, amostras *mecA* positivas e negativas com resistência a oxacilina e/ou cefoxitina, apresentaram tanto o MAR quanto o MCAR superiores aos isolados sensíveis a oxacilina/cefotina, sendo a detecção fenotípica mais sensível no quesito resistência múltipla a antimicrobianos ou classes. Os resultados para todos os antimicrobianos testados mostraram-se bastante homogêneo para amostras MRS detectadas de forma fenotípica, porém não para a detecção genotípica, no entanto, apesar da presença do gene, este pode não estar sendo expresso fenotipicamente.

**Palavras-chave:** antimicrobianos, *mecA*, resistência, *Staphylococcus*

## 7.2. Introdução

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* consistem em cocos gram-positivos, catalase positiva, anaeróbicas facultativas pertencentes à família *Staphylococcaceae*, a qual inclui 41 espécies. São divididas em dois principais grupos: coagulase-positivos (SCP) e coagulase-negativos (SCN), sendo os SCP as espécies mais patogênicas (BOND e LOEFFLER, 2012).

Por serem mais patogênicos, os SCP são as espécies mais importantes na saúde humana e animal, tendo como destaque o *Staphylococcus aureus*, responsável por diversos processos infecciosos em animais e no homem, sendo um dos principais causadores da mastite em bovinos; *Staphylococcus intermedius* agente oportunista e que causa diversas infecções em cães e gatos; *Staphylococcus scheiferi*, principal microrganismo causador de otites em cães e o *Staphylococcus hyicus*, causador da epidermite exudativa em suínos (DEVRIESE et al., 2005; BANDOCH e MELO, 2011).

Outra espécie importante de *Staphylococcus*, principalmente para medicina veterinária, associada principalmente a infecções dermatológicas como pioderma e considerado também um microrganismo oportunista em feridas pós-operatórias e otites (WEESE e VAN DUIJKEREN, 2010; GRIFFETH et al, 2008) foi descrita em 2005 através de análises moleculares de isolados de gato, cachorro, cavalo e papagaio, e, devido ao seu perfil fenotípico ser semelhante tanto ao *S. intermedius* como ao *S. delphini* (uma espécie em golfinho reportada em 1988 por Varaldo e colaboradores), essa espécie foi “chamada” de *Staphylococcus pseudintermedius* (DEVRIESE et al., 2005), sendo ela muitas vezes identificada erroneamente como *S. intermedius* ou *S. aureus* (SASAKI et al., 2007; VAN HOOVELS et al., 2006)

Os *Staphylococcus* spp. são comumente encontrados no meio ambiente, nos animais e no homem (KONEMAN et al., 2001). Por se tratar de bactérias oportunistas, dependendo do *status* imune do animal, infecções como conjuntivite, piodermite, abscessos, bacteremia e otite externa podem ocorrer (LILENBAUM et al., 2000; OLIVEIRA et al. 2006).

Nas últimas décadas, tem-se observado a emergência de microrganismos resistentes aos antibióticos, dentre os quais se destaca o *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina (MRS). Essas linhagens não são comumente relatadas em pequenos animais, entretanto, nos últimos anos, há registros de aumento de casos

de infecções em animais domésticos (RICH et al., 2005; MIDDLETON et al., 2005; SFACIOTTE et al., 2013). Os MRS são frequentemente resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas (LEE et al., 2004).

Um dos principais mecanismos de resistência dos *Staphylococcus* é codificada pelo gene *mecA*, responsável pela produção de uma proteína ligadora de penicilina adicional (PBP 2a), que possui uma baixa afinidade pelos agentes beta-lactâmicos (CASTELLANO-GONZALEZ et al., 2009). A PBP2a atua como uma transpeptidase retomando as funções da síntese de parede celular quando as outras PBPs estão inibidas, garantindo a integridade da célula bacteriana na presença de agentes beta-lactâmicos (HIRAMATSU, 2002). A PBP2a é codificada pelo gene *mecA*, que é transportado por um elemento genético móvel inserido no cromossomo das cepas MRS, chamado cassete cromossômico estafilocócico *mec* (“*staphylococcal cassette chromossome mec*” – SCC*mec*) (ENRIGHT, 2003). A análise da presença deste gene serve como indicativo e auxilia na escolha da melhor terapia antimicrobiana (FERREIRA et al., 2003).

Existem pelo menos treze tipos de SCC*mec* bem definidos e sua caracterização pode ser útil para o entendimento do modo de disseminação das cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) no hospital (HA-MRSA) ou na comunidade (CA-MRSA) (DEURENBERG et al., 2007).

A partir dos anos de 2005 e 2006 houve o surgimento de cepas de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) em toda a Europa, devido à aquisição de SCC*mec* (LOEFFLER et al., 2007; SCHWARZ, KADLEC e STROMMINGER, 2008; RUSCHER et al., 2009). Apesar das cepas de *S. pseudintermedius* raramente colonizarem a pele de seres humanos, a taxa de transporte entre indivíduos exposto a cães é muito alta (GUARDABASSI, LOEBER, JACOBSON, 2004).

Existem alguns métodos para a detecção dos MRS, e estes incluem desde os tradicionais e preconizados pelo CLSI (2008), tais como: a) o teste de disco difusão com os discos de oxacilina e cefoxitina em ágar Mueller Hinton (MH); b) o valor da concentração inibitória mínima (CIM) e c) ou o uso do ágar Screen, onde mistura-se ao MH 6ug de oxacilina em sal e 4% de NaCl e verifica-se qualquer crescimento bacteriano no ágar. Um novo método de detecção dos MRS e já aceito pelo CLSI (2008) é o uso das fitas de E-test, utilizadas na mesma temperatura



aplicada aos testes de disco difusão e sua principal vantagem é fornecer o valor da CIM diretamente.

Apesar das técnicas tradicionais, o principal e mais aceitável método de detecção dos MRS, chamado “padrão ouro”, é Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), capaz de detectar o gene *mecA* responsável pela resistência dos *Staphylococcus* aos antibióticos do grupo beta-lactâmico, sendo um método mais rápido e sensível (OLIVEIRA e LENCASTRE, 2002; SCHISSLER et al., 2009). Outro gene de resistência homólogo ao *mecA* e que também confere resistência aos beta-lactâmicos é o gene *mecC*, sendo que maioria das amostras MRSA *mecC* apresentam um perfil fenotípico diferente, com resistência à cefoxitina, porém com sensibilidade à oxacilina, uma vez que o gene *mecA* confere resistência a ambos (CARTWRIGHT et al., 2013).

Na medicina veterinária, cepas MRSP multirresistentes representam desafio para terapia antimicrobiana devido às poucas opções de tratamento, levando os veterinários a utilizarem antimicrobianos usados para o tratamento de infecções sérias em humanos, o que levanta questões éticas (WEESE e DUIJKEREN, 2010). O uso em medicina veterinária de drogas como a vancomicina e linezolida que são a única escolha para tratamento de MRS em humanos é questionável, devido ao fato da transferência de genes de resistência poder ocorrer entre cepas e espécies diferentes de estafilococos (PERRETEN et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi detectar de forma fenotípica e genotípica estirpes de MRS e avaliar o perfil de resistência antimicrobiana destes isolados.

### 7.3. Material e Métodos

**Amostras clínicas:** foram utilizadas 80 isolados de *Staphylococcus* spp. previamente isolados e identificados, provenientes de animais atendidos na clínica médica e cirúrgica do Hospital Veterinário - HV da Universidade Estadual de Maringá Campus Regional de Umuarama – UEM/CAU. As amostras utilizadas foram provenientes de líquidos corporais (urina, leite), biópsias ou por swab (nasal, otológico, oftálmico, vaginal, cutâneo), dependendo da localização da infecção, sendo coletado das espécies caninas e felinas. As amostras, após prévio crescimento e identificação, ficaram estocadas a -20°C na bacterioteca do

Laboratório de Microbiologia e Doenças Infecciosas da Universidade Estadual de Maringá, *Campus Umuarama*.

**Isolamento e identificação bacteriana:** as amostras clínicas foram inicialmente incubadas em caldo BHI (caldo de infusão cérebro-coração) por quatro a 12 horas a 36° C, seguindo pela inoculação em ágar sangue de ovelha a 5% desfibrinado e ágar MacConkey, com incubação por 24 a 36° C. As colônias isoladas foram identificadas por características morfofototinturiais pela coloração de gram e por provas bioquímicas (catalase, oxidase, coagulase em tubo e em lâmina, Agar manitol).

**Resistência antimicrobiana:** o perfil de resistência antimicrobiana foi realizado segundo Bauer et al. (1966) pela técnica de disco-difusão. As colônias isoladas foram inoculadas em MH com incubação por 24 horas a 35° C. Os halos de inibição de crescimento foram medidos e interpretados segundo recomendação do CLSI (2008). Foram testados os seguintes beta-lactâmico penicilínico: penicilina G 10U; beta-lactâmicos aminopenicilínicos: amoxicilina 10 µg e ampicilina 10 µg; beta-lactâmicos aminopenicilínicos associados a inibidores de beta-lactamases: amoxicilina+ácido clavulônico 30 mcg e ampicilina+sulbactam 20 µg; beta-lactâmico penicilínico semi-sintético: oxacilina 1 µg; beta-lactâmicos ceféns cefalosporínicos: 1ª geração - cefalexina 30 mcg e cefalotina 30 µg e 3ª geração - ceftriaxona 30 µg; cefén cefamicínico: cefoxitina 30 mcg; beta-lactâmicos carbapenêmicos: imipenem 10 mcg e meropenem 10 µg; glicopeptídeo: vancomicina 30 µg; aminoglicosídeos: gentamicina 10 µg, estreptomicina 10 µg, amicacina 30 µg, neomicina 30 µg e tobramicina 10 µg; macrolídeos: 14 carbonos - eritromicina 15 µg e 15 carbonos - azitromicina 15 µg; lincosamina: clindamicina 2 µg; ansamicina: rifampicina 5 µg; fenicol: cloranfenicol 30 µg; fluoroquinolona: enrofloxacin 05 µg, norfloxacin 10 µg, ciprofloxacin 5 µg e levofloxacin 5 µg; tetraciclina: tetraciclina 30 µg e doxiciclina 30 µg; e inibidor do PABA: sulfazotrim 25 µg (NEWPROV®).

**Deteção de isolados multirresistentes:** O índice MAR (múltipla resistência antimicrobiana), calculado pelo número de antimicrobianos resistentes divididos pelo número de antimicrobianos testados, foi avaliado segundo Krumperman (1983). Outro índice avaliado, foi o índice MCAR (múltipla resistência a classe antimicrobiana), foi calculado pela razão entre o número de classes contra as quais cada isolado foi resistente e o número total de classes (12) (Krumperman, 1983). Foram consideradas multirresistentes as estirpes que mostraram fenótipo

resistente a pelo menos três classes antimicrobianas testadas (MCAR maior ou igual a 0,25) (Ngoi & Thong, 2013).

**Deteção fenotípica da resistência a meticilina:** a resistência a meticilina/oxacilina foi avaliada por disco-difusão em ágar Muller Hinton (MH) com os discos impregnados com oxacilina e cefoxitina, onde as amostras foram transferidas para um tubo com solução salina 0,85% até a concentração padronizada de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml (turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland). Com auxílio do *swab*, as amostras foram semeadas nas placas contendo MH, e então adicionados os discos. A leitura foi realizada após 24 horas de incubação a 35°C pela medição do diâmetro do halo de inibição segundo as recomendações do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI) (2008).

**Extração do DNA bacteriano:** A extração foi realizada de acordo com a metodologia de Doyle e Doyle (1987), onde os isolados previamente identificados como *Staphylococcus* spp. foram plaqueados em Agar Padrão de Contagem (PCA) e incubados a 36°C por 24/48 horas. A seguir, as colônias foram transferidas para microtubos contendo 200 µL de Tris-EDTA (TE) e centrifugadas a 8000 xG por cinco minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em 600 µL de Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) e 40 µL de Clorofórmio/Álcool-Isoamílico (CIA) e posteriormente aquecido em banho-maria a 65°C por 30 minutos para a lise celular. Após o banho-maria, adicionou-se 800 µL de CIA seguido de centrifugação por 10 minutos em temperatura ambiente à 12000 xG. O sobrenadante (aproximadamente 500 µL) foi transferido para outro microtubo contendo 500 µL de isopropanol gelado e esta mistura incubada a -20°C *overnight*. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 13500 xG por 20 minutos a -4°C, sendo o sobrenadante descartado e os microtubos colocados em fluxo laminar para a secagem completa do DNA. Após a secagem, o DNA purificado foi suspenso em 200 µL de TE e acondicionado em temperatura -20°C até sua utilização.

**Reação em Cadeia da Polimerase (PCR):** a detecção do gene *mecA* foi realizada utilizando o par de iniciadores desenhados com auxílio do software Gene Runner (versão 3.0 – Copyright © 1994 Hasting Software, Inc.), sendo ele: 5' GATGATACCTTCGTTCCAC3' (nt 622-640) e 5'GTATGTGCGATTGTATTGC3' (nt 917-935) que amplificam um produto de 314 pares de base. A reação de amplificação seguiu o seguinte programa: 10min a 95 °C, seguidos por 30 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 52 °C e 1min a 72 °C. O programa terminou com uma extensão

adicional de 10min a 72 °C. Como controle positivo para MRS foi utilizado a ATCC 43300 e como controle negativo, água ultrapura. Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% após coloração com brometo de etídio.

**Análise estatística:** Os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva para cálculo das frequências absoluta e relativa (PETRIE e WATSON, 2009; SAMPAIO, 2010).

#### 7.4. Resultados e discussão

Oitenta amostras de *Staphylococcus* spp foram avaliadas, onde todos foram positivos para o teste de coagulase e então identificados como *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), assim como mostra a Figura 7. Dessas 80 amostras, 93,75% (75/80) foram provenientes de cães e 6,25% (5/80) de gatos compreendendo 26 amostras cutâneas, 22 otológicas, 18 oftálmicas, seis vaginais, quatro nasais, duas urinas, um amostra de leite e um swab oral, assim como descritos na Tabela 9. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Garbacz et al. (2013) e diferiram de Haenni et al. (2014) apenas na quantidade de infecções urinárias que foram superiores às oftálmicas.



**Figura 7:** Teste da Coagulase em tubo com a formação de coágulos, indicando a positividade do teste.

Fonte: Arquivo pessoal (2013)

**Tabela 9:** Distribuição em frequência total e frequência de MAR $\geq$ 0.2 de isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva encontrados nos diferentes sistemas orgânicos caninos e felinos com infecção.

Amostras	Quantidade			Porcentagem (%)		
	Cães	Gatos	Total	Cães	Gatos	Total
Cutâneas	24	2	26	30	2,5	32,5
Otológicas	21	1	22	26,25	1,25	27,5
Oftálmicas	17	1	18	21,25	1,25	22,5
Vaginais	6	0	6	7,5	0	7,5
Nasais	4	0	4	5	0	5
Urina	1	1	2	1,25	1,25	2,5
Leite	1	0	1	1,25	0	1,25
Oral	1	0	1	1,25	0	1,25
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>5</b>	<b>80</b>	<b>93,75</b>	<b>6,25</b>	<b>100</b>

Até 2005 os estudos sobre *Staphylococcus* coagulase positiva isolada de animais indicavam que a espécie mais prevalente era a *S. intermedius*, porém Devriese et al. (2005), por meio de análises moleculares descreveram uma nova espécie de *Staphylococcus* e devido ao seu perfil fenotípico ser semelhante tanto ao *S. intermedius* quanto ao *S. delphini*, essa espécie foi “chamada” de *Staphylococcus pseudintermedius* (DEVRIESE et al., 2005) e juntas, essas três espécies fazem parte do Grupo *Staphylococcus Intermedius* (S.I.G). Após a descoberta dessa espécie, muitos estudos foram realizados e verificou-se que isolados provenientes de cães antes identificados como *S. aureus* ou *S. intermedius* eram na verdade *S. pseudintermedius* (SASAKI et al., 2007). Com isso, foi proposto que toda estirpe isolada de cães seria reportada como *S. pseudintermedius* a menos que fosse feita uma investigação genômica provando ao contrário. Sendo assim, no presente trabalho, todas as amostras foram identificadas como *S. pseudintermedius*, uma vez que não foram realizados testes moleculares para identificação da espécie.

Um total de 2285 avaliações de drogas antimicrobianas foram realizadas, onde, segundo o CLSI (2008), 1354 (59,25%) foram consideradas sensíveis *in vitro*, 146 (6,39%) apresentaram resistência intermediária e 785 (34,35%) foram resistentes, totalizando assim, 931 (40,74%) dos teste com resistência parcial ou total. As amostras reportadas com resistência intermediária foram computadas como resistente para efeitos estatísticos, uma vez que também não é aconselhável o seu uso na clínica médica.

A oxacilina e a cefoxitina são, segundo CLSI (2008), drogas para a predição de resistência em *Staphylococcus* spp. a todos os beta-lactâmicos, sendo chamado de *Staphylococcus* spp. resistente a metilina (MRS). Na detecção fenotípica de

MRS, 58,75% (47/80) os isolados de *Staphylococcus* spp. apresentaram resistência à oxacilina e 53,75% (43/80) à cefoxitina, sendo que apenas dois isolados resistentes à cefoxitina apresentaram sensibilidade à oxacilina, totalizando assim 49 amostras fenotipicamente MRS. Quando realizada a PCR para detecção do gene *mecA*, 23 (28,75%) isolados foram positivos, onde apenas dois apresentaram sensibilidade à cefoxitina e à oxacilina no teste fenotípico e um apresentou resistência apenas à cefoxitina. Esses resultados mostram uma sensibilidade de 87,5% para a cefoxitina e de 83,33% para oxacilina (Tabelas 10 e 11), indicando valores abaixo dos encontrados por Felten et al. (2002), Witte et al. (2007) em ambos os discos, porém, quando comparado com Skov et al. (2006) (sensibilidade de 78%) o disco de oxacilina apresentou uma maior sensibilidade.

**Tabela 10:** Análise da sensibilidade das técnicas de detecção fenotípica de MRS por disco-difusão com oxacilina e detecção genotípica de MRS por PCR para o gene *mecA*.

		PCR			
		Positivo	Negativo	Total	
Disco- difusão com Oxacilina	Resistente	20	27	47	VPP= 42,55%
	Sensível	4	29	33	VPN= 87,88%
	Total	24	56	80	
		Sensibilidade	Especificidade		
		83,33%	51,79%		

**Tabela 11:** Análise da sensibilidade das técnicas de detecção fenotípica de MRS por disco-difusão com cefoxitina e detecção genotípica de MRS por PCR para o gene *mecA*.

		PCR			
		Positivo	Negativo	Total	
Disco- difusão com Cefoxitina	Resistente	21	22	43	VPP= 48,84%
	Sensível	3	34	37	VPN= 91,89%
	Total	24	56	80	
		Sensibilidade	Especificidade		
		87,5%	60,71%		

De acordo com o CLSI (2013), os isolados que apresentaram o gene *mecA*, mesmo que *in vitro* tenham apresentado sensibilidade a qualquer antimicrobiano da classe dos beta-lactâmicos, devem ser reportados como resistente, não sendo indicado na terapia de infecções por esse tipo de micro-organismo.

Segundo Krumperman (1983), uma cepa bacteriana é considerada multirresistente quando o valor do índice MAR for igual ou superior a 0,2, sendo que no presente trabalho 53 (66,25%) amostras obtiveram valores superiores a esse e 27 (33,75%) apresentaram MAR abaixo de 0,2. O valor médio para o índice MAR de todas as amostras foi de 0,34. Já o MCAR, 54 (67,50%) isolados apresentaram valores maiores ou iguais a 0,25, sendo resistente a três ou mais classes antimicrobianas, tendo um valor médio de 0,38. Penna et al. (2010) e Mendes (2011) encontraram 77,1 e 73,6% respectivamente de amostras multirresistentes, valor esse acima do encontrado no presente estudo, porém, se comparado com estudo de Monchique (2013) realizado em Portugal (34,46%), a quantidade de *Staphylococcus* multirresistente foi praticamente o dobro, o que pode ser explicado pelo fato das amostras utilizadas serem entre os anos de 1999 e 2006 e a emergência de MRSP em Portugal ter ocorrido em 2009. Em outro estudo realizado em Portugal por Couto et al. (2014), na mesma região do estudo anterior, porém com amostras coletadas entre os anos de 2007 e 2011, o número de isolados multirresistentes aumentou (55%), mas ainda ficou abaixo do presente estudo.

Avaliando-se a os isolados MRS e MSS, amostras *mecA* positivas e negativas com resistência a oxacilina e/ou cefoxitina, apresentaram tanto o MAR quanto o MCAR superiores aos isolados sensíveis a oxacilina/cefotaxima, sendo a detecção fenotípica mais sensível no quesito resistência múltipla a antimicrobianos ou classes (tabela 12). Os resultados para todos os antimicrobianos testados mostraram-se bastante homogêneo para amostras MRS detectadas de forma fenotípica, porém não para a detecção genotípica, como mostra a tabela 12, no entanto, apesar da presença do gene, este pode não estar sendo expresso fenotipicamente.

**Tabela 12:** Perfil de resistência fenotípica a drogas antibacterianas de amostras MRS e MSS detectadas de forma fenotípica (OXA/CFO) e genotípica (*mecA*)

Antimicrobianos	PCR	<i>mecA</i> +		<i>mecA</i> -		Total
		OXA/CFO R (%)	OXA/CFO S (%)	OXA/CFO R (%)	OXA/CFO S (%)	
Beta-lactâmicos	Penicilina G	95,24	0	92,86	57,14	78,48
	Ampicilina	90,48	0	74,07	48,28	67,09
	Amoxacilina	90,48	0	57,14	28,57	54,43
	Amoxacilina + Clavulanato	38,10	0	25	0	18,75
	Ampicilina + Sulbactam	31,25	0	16,67	0	13,11

	Cefalexina	57,89	50	48,15	10,71	36,84
	Cefalotina	47,62	50	50	10,34	35
	Ceftriaxona	52,38	0	57,14	10,34	37,5
	Meropenem	5,26	0	17,39	0	7,04
	Imipenem	0	0	0	0	0
<b>Glicopeptídeos</b>	Vancomicina	61,90	0	33,33	7,14	30,77
	Gentamicina	42,86	0	42,86	6,90	28,75
	Estreptomicina	70,59	0	64	8,70	44,78
<b>Aminoglicosídeos</b>	Amicacina	33,33	0	39,29	0	22,78
	Neomicina	68,75	0	64	20	48,48
	Tobramicina	42,86	0	46,43	0	27,85
<b>Macrolídeos</b>	Eritromicina	100	50	78,57	28,57	65,38
	Azitromicina	76,19	0	64,29	13,79	47,50
<b>Lincosaminas</b>	Clindamicina	90,48	50	71,43	24,14	58,75
<b>Fenicol</b>	Cloranfenicol	23,81	0	29,63	3,45	17,72
<b>Sulfas</b>	Sulfazotrim	85	50	55,56	34,48	55,13
<b>Ansamicina</b>	Rifampicina	57,89	0	65,22	7,41	39,44
<b>Tetraciclina</b>	Tetraciclina	80,95	0	64,29	37,93	57,50
	Doxaciclina	52,38	0	50	13,79	36,25
	Enrofloxacin	85,71	0	42,86	20,69	45
	Norfloxacin	66,67	0	46,43	17,86	40,51
<b>Fluoroquinolonas</b>	Ciprofloxacina	68,42	0	54,55	15,38	42,03
	Levofloxacina	57,14	0	32,14	20,69	33,75
<b>MAR</b>		0.55	0.08	0.433	0.12	0.43

Em relação ao perfil de resistência isolado das estirpes bacterianas estudadas frente aos agentes antimicrobianos, apenas a penicilina G apresentou resistência superior a 70% (R=78,48%). Os antimicrobianos que apresentaram porcentagem de resistência entre 50 e 70% foram: o macrolídeo eritromicina (R=65,38%), os beta-lactâmicos aminopenicilínicos: ampicilina (R=67,09%) e amoxicilina (R=54,43%); a clindamicina (R=58,75%) representante da classe lincosamida; a tetraciclina (R=57,50%); e o sulfazotrim (R=55,13%). As drogas consideradas menos resistentes foram os carbapenêmicos: meropenem (R=7,04) e imipenem (R=0%); os beta-lactâmicos associados a inibidores de betalactamases, sulbactam com ampicilina (R=13,11%) e clavulanato com amoxicilina (R=18,75%); e o cloranfenicol (17,72%). Sendo significativo, para todos estes antimicrobianos, a



resistência encontrada em amostras oxacilina/cefotina resistentes das sensíveis, com exceção do imipenem.

Macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B formam o grupo MLS<sub>B</sub> de antibióticos, pois apesar de possuírem fórmulas diferentes, apresentam o mesmo mecanismo de ação, inibindo a síntese proteica através da ligação ao receptor 23s do rRNA que faz parte da subunidade 50s do ribossomo bacteriano. Em MRSA isolados de seres humanos e animais, a resistência à clindamicina induzida já é bem documentada (RUBIN et al., 2011). Sabe-se que a pressão antimicrobiana acarreta na seleção de bactérias resistentes ao grupo MLS<sub>B</sub>, porém a transferência horizontal de genes de resistência também é bem elucidada (PATTERSON et al., 2007).

Os macrolídeos testados apresentaram resistência de 65,38% para eritromicina e 47,5% a azitromicina, resultados semelhantes aos encontrados por Pereira et al. (2009), que detectaram 47,3% de resistência a azitromicina. Quando avaliados apenas os isolados oxacilina/cefotina resistentes, a resistência à classe aumenta consideravelmente, chegando a 100% para eritromicina em isolados *mecA*<sup>+</sup> e 78,57% *mecA*<sup>-</sup>. Já a lincosamida testada (clindamicina) apresentou resistência em 58,75% dos isolados, sendo que Ishii et al. (2011) encontraram resistência à clindamicina em 82,3% das amostras e Sfaciotte et al. (2014) em 100%. Em isolados MRS, a resistência à clindamicina foi de 86,96%. Assim, apenas um isolado MRS não apresentou resistência a pelo menos um desses antimicrobianos, resultado muito próximo ao encontrado por Kim et al. (2004) que constataram resistência em 97% dos MRSA.

Os antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) foram considerados por muito tempo a última alternativa para o tratamento de micro-organismos Gram positivos multirresistentes, principalmente os MRS. Os resultados encontrados neste estudo, utilizando a disco-difusão, mostraram que das 80 amostras, 55 (69,33%) foram susceptíveis *in vitro* à vancomicina e 25 (30,77%) necessitam de nova avaliação por CIM para este antimicrobiano, uma vez que de acordo com o CLSI (2008) somente pode ser reportado VISA e VRSA, através do CIM. Até então, de acordo com Monchique (2013), nenhuma amostra VRSA foi identificada na medicina veterinária, o que está de acordo com Haenni et al. (2014) que não identificaram nenhum isolado resistente à vancomicina.

O cloranfenicol apresentou resistência de 17,72% dos isolados estudados, valor esse parecido com Bordin et al. (2014), Mendes (2011) e Vanni et al. (2009)

que encontraram 19%, 16,7% e 14,9% respectivamente, porém inferior ao encontrado por Mantilla e Franco (2012), 59,2%. Para isolados com a presença do gene *mecA*, o cloranfenicol foi o antimicrobiano que melhor apresentou sensibilidade, 78,26%, sendo portando o mais indicado para tratamento desse tipo de micro-organismo.

Em relação aos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos, cinco drogas foram testadas, sendo elas: amicacina, gentamicina, neomicina, tobramicina e estreptomicina, com percentual de resistência de 22,78%, 28,75%, 48,48%, 27,85% e 44,78% respectivamente. A similaridade entre a neomicina e a estreptomicina, assim como a amicacina, gentamicina e tobramicina é explicado pela forte relação entre esses antimicrobianos a quais possuem mecanismos de ação parecidos (MONCHIQUE, 2013). Os resultados encontrados no presente trabalho foram maiores que os encontrados por Mendes (2011), que encontrou 18% de resistência à gentamicina.

A fluoroquinolona é a única classe de antimicrobiano que age diretamente no DNA bacteriano, especificamente nas enzimas topoisomerase IV e DNA girase (BLONDEAU, 2004) e sua resistência deve ser reportada em conjunto, assim como preconiza o CLSI (2013), onde a resistência a uma droga implica a resistência a toda a classe. No presente estudo foram utilizados quatro antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, sendo três deles considerados de 2º geração (norfloxacin, enrofloxacin e ciprofloxacin) e um da 3º geração (levofloxacin), com percentuais de resistência de 45% para enrofloxacin, 40,51% para norfloxacin, 42,03% para ciprofloxacin e 33,75% para levofloxacin. De acordo com Marangon et al. (2004), a resistência às quinolonas em isolados MRS é comum, o que pode ser observado no presente estudo, uma vez que apenas cinco (21,73%) das amostras que apresentaram o gene *mecA* foram sensíveis a todos os antimicrobianos dessa classe, resultados esses semelhantes aos de Asbell et al. (2008), que encontraram uma sensibilidade de 15,2% para ciprofloxacin e 21,2% para levofloxacin em amostras humanas.

O sulfazotrim, antimicrobiano da classe dos inibidores do ácido fólico, apresentou resistência em 55,13% dos isolados, valor esse próximo ao encontrado por Cruz et al. (2012), 52,38%, porém abaixo dos valores encontrados por Sfaiotte et al. (2014) e Dal-Bó et al. (2013), 100% e 75% respectivamente. Quando analisada a resistência em isolados genotipicamente MRS esse número aumenta para

81,82%. Esses altos índices de resistência aos antimicrobianos da classe das sulfas pode ser explicado devido à sua ampla utilização durante muitos anos na medicina veterinária, sem muitas vezes critério (CRUZ et al., 2012). Já a rifampicina com 39,44% de resistência (52,38% em amostras MRS) também não é aconselhável para terapia empírica antimicrobiana, principalmente em cepas MRS, assim como descrito por Bordin et al. (2014) e indo contra ao descrito por Mendes (2011) que encontrou uma resistência de apenas 2,8%.

### 7.5. Conclusão

Os resultados do presente trabalho demonstraram a dificuldade da escolha terapêutica em amostras consideradas multirresistentes, principalmente os MRS. A identificação da resistência aos beta-lactâmicos, tanto de forma fenotípica quanto genotípica, mostrou que não somente os antimicrobianos dessa classe, mas em todas as classes testadas, apresentaram um aumento no perfil de resistência frente as drogas testadas.

Com a utilização indiscriminada das drogas antimicrobianas que acontece na medicina veterinária, o número de isolados multirresistentes vem crescendo. A emergência de cepas multirresistentes já é uma realidade que deve ser melhor observada pelos profissionais tanto clínicos quanto cirurgiões, uma vez que esses genes de resistência podem ser transmitidos entre bactérias da microbiota animal para a microbiota humana, gerando um grande problema em saúde pública.

### 7.6. Referências

- ASBELL, P.A., COLBY, K.A., DENG, S., MCDONELL, P., MEISLER, D.M., RAIZMAN, M.B., SAHN, D.F. Ocular TRUST: Nationwide Antimicrobial Susceptibility Patterns in Ocular Isolates. **American Journal of Ophthalmology**, v.145, n.6, p.951-958, 2008.
- BANDOCH, P.; MELO. Prevalência de mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: uma revisão bibliográfica. Publicatio UEPG: **Ciências Biológicas e da Saúde**. Ponta Grossa, v17, n.1, p.47-51, 2011.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M., SHERRIS J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v. 45, n.4, p.493-496, 1966.

BLONDEAU, J.M. Fluoroquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance. **Survey of Ophthalmology**, v.49, p.1513-1523, 2004.

BOND, R., LOEFFLER, A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. **J. Small Anim Pract.**, v.53, p.147-154, 2012

BORDIN, J.T.; SFACIOTTE, R.A.P.; CORONEL, L.G.; MENDES, L.M.; VIGNOTO, V.K.C.; DE CONTI, J.B.; WOSIACKI, S.R. Identificação de cepas bacterianas multirresistentes isoladas de feridas de pequenos animais do Hospital Veterinário da UEM. **Pesq. Vet. Bras.** (artigo enviado), 2014.

CARTWRIGHT, E. J. P.; PATERSON, G. K.; RAVEN, K. E.; HARRISON, E. M.; GOULIOURIS, T.; KEARNS, A.; PICHON, B.; EDWARDS, G.; SKOV, R. L.; LARSEN, A. R.; HOLMES, M. A.; PARKHILL, J.; PEACOCK, S. J.; TOROK, M. E. Use of Vitek 2 antimicrobial susceptibility profile to identify *mecC* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.51, p.2732–2734, 2013.

CASTELLANO-GONZALEZ, M. J., et al. Molecular and phenotypical typification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in a university hospital. **Rev. Chilena. Infectol.**, v.26, p.39-48, 2009.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard – Third Edition. M31-A3. v.28, n.8, 2008.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2013.

COUTO, N., BELAS, A., COUTO, I., PERRETEN, V. & POMBA, C. Genetic relatedness, antimicrobial and biocide susceptibility comparative analysis of methicillin-resistant and –susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* from Portugal. **Microbiology Drug Resistance**, v.20, n.4, p.364-371, 2014.

CRUZ, A.R. Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. 78f, 2009.

DAL-BÓ, I.S., FERRIGNO, C.R.A., FERREIRA, M.P., CAQUIAS, D.F.I., SOUZA, A.N.A., RIZZO, M.F.C.I., CAVALCANTI, R.A.O., SANTOS J.F.. Infecção óssea após osteotomia para tratamento da ruptura de ligamento cruzado em cães. **Revista Acta Scientiae Veterinariae** v.41, p.1148, 2013.

DEURENBERG, R. H., et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.13, p.222-235, 2007.

DEVRIESE, L.A., et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.55, p.1569-1573, 2005.

DOYLE & DOYLE. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 1987.

ENRIGHT, M. C. The evolution of a resistant pathogen--the case of MRSA. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v.3, p.474-479, 2003.

FELTEN, A. et al. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system and the MRSA-screen latex agglutination test. **J Clin Microbiol**, v. 40, p. 2766-71, 2002.

FERREIRA, R.B.R. et al. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the Agar screen test by using different concentrations of oxacillin. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.8, p.3609-3614, 2003.

GARBACZ, K., ZARNOWSKA, S., PIECHOWIEZ, L., HARAS, K. Staphylococci Isolated from Carriage Sites and Infected Sites of Dogs as a Reservoir of Multidrug Resistance and Methicillin Resistance. **Curr Microbiol.**, v.66, p.169–173, 2013.

GRIFFETH, G.C.; MORRIS, D.O.; ABRAHAM, J.L.; SHOFER, F.S.; RANKIN, S.C. - Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. **Vet. Dermatol.**, v.19, p.142-149, 2008.

GUARDABASSI, L., LOEBER, M. E., JACOBSON, A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. **Vet. Microbiol.**, v.98, p.23-27, 2004.

HAENNI, M., MORAES, N.A., CHÂTRE, P., MÉDAILLE, C., MOODLEY, A., MADEC, J.Y. Characterisation of clinical canine methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in France. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.2, p.119–123, 2014.

HIRAMATSU, K., et al. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.292, p.67-74, 2002.

ISHII, J.B., FREITAS, J.C., ARIAS, M.V.B. Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31, n.6, p.533-537, 2011.

KIM, H. B.; LEE, B.; JANG, H. C.; KIM, S. H.; KANG, C. I.; CHOI, Y. J.; PARK, S. W.; KIM, B. S.; KIM, E. C.; OH, M. D.; CHOE, K. W. A high frequency of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance determinants in *Staphylococcus aureus* isolated in South Korea. **Microb Drug Resist.** v.10, n.3, p.248-54, 2004.

KONEMAN E W, et al. The gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organisms. In: Koneman, E. W., et al. Editors. Atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia, USA: Lippincott, p.539-576, 2001.

KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk source of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, v.46, n.1, p.165-170, 1983

LEE, J. H. et al. Evaluation of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.2780-2782, 2004.

LILENBAUM, W., et al. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.31, p.42-45, 2000.

LOEFFLER, A., et al. First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. **Vet. Dermatol.**, v.18, p.412-421, 2007

MARANGON FB, MILLER D, MUALLEM MS, ROMANO AC, ALFONSO EC. Ciprofloxacin and levofloxacin resistance among methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolates from keratitis and conjunctivitis. **Am J Ophthalmol.**, v.137, n.3, p.453-8, 2004.

MENDES, W.R.S. Resistência *in vitro* aos antimicrobianos de isolados de *Staphylococcus* spp. associados a dermatites canina. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. 95f, 2011.

MIDDLETON, J. R., et al. Surveillance of *Staphylococcus aureus* in veterinary teaching hospitals. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.6, p.2916-2918, 2005.

MONCHIQUE, C. R. O. EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM *STAPHYLOCOCCUS* SPP. –1999 a 2006. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Dissertação de Mestrado, 2013.

NGOI, S.T., THONG, K.L. Molecular characterization showed limited genetic diversity among *Salmonella* Enteritidis isolated from humans and animals in Malaysia. **Diag. Microbiol. Infect. Disease**, v.77, p.304-311, 2013.

OLIVEIRA L.C., BRILHANTE R.S.N., CUNHA A.M.S., CARVALHO, C.B.M. Profile of microorganisms isolated from dogs with associated media and extern otitis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.58, n.6, p.1009-1017, 2006.

OLIVEIRA, D. C., DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Chemother**, v.46, p.2155-2161, 2002.

PENNA, B., VARGES, R., MARTINS, R., MARTINS, G., Lilenbaum, W. *In vitro* antimicrobial resistance of staphylococci isolated from canine urinary tract infection. **The Canadian Veterinary Journal**, v.51, p.738-742, 2010.

PEREIRA, I.A., SOARES, L.C., COELHO, S.M.O., PRIBUL, B.R., SOUZA, M.M.S. Suscetibilidade à azitromicina de isolados bacterianos de processos infecciosos em cães e gatos. **Pesq. Vet. Bras.** v.29, n.2, p.153-156, 2009.

PERRETEEN, V.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; GRÖNLUND ANDERSSON, U.; FINN, M.; GREKO, C.; MOODLEY, A.; KANIA, S. A.; FRANK, L. A.; BEMIS, D. A.; FRANCO, A.; IURESCIA, M.; BATTISTI, A.; DUIM, B.; WAGENAAR, J. A.; VAN DUJCKEREN, E.; WEESE, J. S.; FITZGERALD, J. R.; ROSSANO, A.; GUARDABASSI, L. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicenter study. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.65, p.1145–1154, 2010.

RICH, M., et al. Clindamycin resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. **Vet. Microbiol.**, v.111, p.237-240, 2005.

RUBIN, J. E.; BALL, K. R.; CHIRINO-TREJO, M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. **Can Vet J.**, v.52, p.153–7, 2011.

RUSCHER, C., et al. Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. **Vet. Microbiol.**, v.136, p.197-201, 2009.

SASAKI, T., et al. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v.45: 2770-8, 2007.

SCHISLER, J.R. et al. Evaluation of Clinical Laboratory Standards Institute Interpretative Criteria for Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, p.684-688, 2009.

SCHWARZ, S., KADLEC, K., STROMMINGER, B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004-2006 in Germany. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.61, p.282-285, 2008.

SFACIOTTE R.A.P., VIGNOTO V.K.C. & WOSIACKI S.R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados bacterianos de afecções clínicas do hospital veterinário da Universidade Estadual de Maringá. **Rev. Ci. Vet. Saúde Public.** v.1, n.1, p.29-38, 2014.

SFACIOTTE, R. A. P. ; CORONEL, L. G. ; BORDIN, J. T. ; VIGNOTO, V.K.C ; OSAKI, S. C. ; WOSIACKI, S. R. . Resistência Multipla a Antmicrobianos em *Staphylococcus* spp. e Detecção de Amostras Meticilina Resistentes. 2013. **Revista Ars Veterinária** v.29, Sup. 1, 2013

SKOV, R. et al. Phenotypic Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by Disk Diffusion Testing and Etest on Mueller-Hinton Agar. **J Clin Microbiol**, v.44, p.4395-4399, 2006.

VAN HOOVELS, L., et al. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. **J. Clin. Microbiol**, v.44, p.4609–4612, 2006.

VANNI, M., TOGNETTI, R., PRETTI, C., CREMA, F., SOLDANI, G., MEUCCI, V., INTORRE, L. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and

*Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. **Research in Veterinary Science**, v.87, p.192-195, 2009.

WEESE, J. S., VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Vet Microbiol**, v.140, p.418-429, 2010.

WITTE, W.; PASEMANN, B.; CUNY, C. Detection of low-level oxacillin resistance in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*. **Clin Microbiol Infect**, v. 13, p. 408-12, 2007.

## 8. CONCLUSÃO GERAL

Os principais patógenos bacterianos de pequenos animais, isolados e identificados, foram os *Staphylococcus* spp., enterobactérias, *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas* spp.;

O perfil de resistência fenotípica observada foi elevado, mostrando resistência geral a drogas antimicrobianas acima de 40% das avaliações realizadas;

Foram detectadas as cepas multirresistentes MRS, MRS-MLSb, VRE e ESBL em algumas das amostras estudadas. Foram detectadas amostras de *Staphylococcus* spp. com o gene *mecA*. A emergência de cepas multirresistentes já é uma realidade na medicina veterinária;

O perfil de resistência a antimicrobianos mostrou uma grande diferença para MRS quando comparado a MSS;

Os resultados do presente trabalho demonstraram a dificuldade da escolha terapêutica em amostras consideradas multirresistentes, principalmente os MRS. A identificação do gene de resistência aos beta-lactâmicos, *mecA*, mostrou que não somente os antimicrobianos dessa classe, mas em todas as classes testadas, apresentaram um aumento no perfil de resistência frente as drogas testadas;

Os resultados do presente trabalho demonstram a necessidade do monitoramento constante do perfil de resistência bacteriana, que varia ao longo dos anos e difere de local para local;

A realização de testes para identificação bacteriana e sua suscetibilidade podem auxiliar na seleção apropriada do agente antimicrobiano, mostrando-se essencial para a clínica médica e cirúrgica devido a altas taxas de resistência bacteriana verificadas, assim como o monitoramento da resistência local com o uso contínuo de determinadas drogas antimicrobianas.